



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

AVALIAÇÃO DE DUAS TÉCNICAS SEROLÓGICAS (IFI E ELISA) E UMA TÉCNICA
MOLECULAR (qPCR EM AMOSTRA DE PELE) NO DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO POR
LEISHMANIA INFANTUM EM CÃES

ANA SOFIA FILIPE FRANCO RIBEIRO

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José Augusto Farraia e Silva Meireles

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da Fonseca
de Sampaio

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

ORIENTADORA

Doutora Isabel Maria Soares
Pereira da Fonseca de Sampaio

CO-ORIENTADORA

Mestre Ana Teresa Severino
Caldeira Reisinho

2014

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

AVALIAÇÃO DE DUAS TÉCNICAS SEROLÓGICAS (IFI E ELISA) E UMA TÉCNICA
MOLECULAR (qPCR EM AMOSTRA DE PELE) NO DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO POR
LEISHMANIA INFANTUM EM CÃES

ANA SOFIA FILIPE FRANCO RIBEIRO

Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José Augusto Farraia e Silva Meireles

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da Fonseca
de Sampaio

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

ORIENTADORA

Doutora Isabel Maria Soares

Pereira da Fonseca de Sampaio

CO-ORIENTADORA

Mestre Ana Teresa Severino

Caldeira Reisinho

2014

LISBOA

Recomeça... se puderes, sem angústia e sem pressa e os passos que deres, nesse caminho duro do futuro, dá-os em liberdade, enquanto não alcances não descanses, de nenhum fruto queiras só metade.”

Miguel Torga

Agradecimentos

À Professora Doutora Isabel Fonseca um grande obrigada, por todo o tempo que despendeu comigo, por toda a ajuda que me prestou, simpatia e todo o conhecimento que me transmitiu nestes seis anos de vida académica.

À Mestre Ana Teresa Reisinho agradeço do fundo do coração pela amizade, disponibilidade, alegria e prontidão com que aceitou fazer parte do meu percurso e realização da minha tese, pelas nossas discussões e apresentações de temas, por todo o grande e constante apoio que me deu.

À Professora Doutora Ana Duarte, ao Mestre Marcos Santos, à Dr^a Clara Cartaxeiro e à restante equipa que tanto me ajudaram na realização do meu trabalho laboratorial, no laboratório de Virologia da FMV-ULisboa, muito obrigada pela vossa paciência, atenção e dedicação.

À Dr^a Lúcia Gomes um grande obrigada pela amizade, paciência e ajuda a melhor entender e realizar as técnicas laboratoriais, no laboratório de parasitárias da FMV-ULisboa.

Ao Dr^o Telmo Nunes, agradeço todo o apoio que me deu na parte estatística da tese.

A toda a equipa do Hospital FMV, muito obrigada pelos conhecimentos transmitidos nestes seis longos meses de trabalho e aprendizagem. Obrigada pelos bons e maus momentos, pelo constante trabalho em equipa e pelo espírito de entre ajuda tantas vezes presente. Um especial obrigada à equipa Cirúrgica do Hospital FMV pelos excelentes momentos que me proporcionaram nas “catacumbas”, onde aprendi, ganhei autonomia, ri e fiz amizades.

À Professora Berta São Braz e Professor Luís Madeira de Carvalho, quero também agradecer a amizade, todo o apoio e disponibilidade sempre presentes ao longo destes anos.

Ao Dr^o Jorge Norte da ESTEVE e à Dr^a Andreia Oliveira pelo apoio e oferta do kit para a realização de parte do trabalho da tese, agradeço-vos muito.

Agradeço bastante pelo apoio parcial por parte do Projeto PTDC/CVT/118566/2010, da FCT.

Ao meu amigo David Ramilo pelos ensinamentos, bons momentos, conversas, risadas e por me fazer voar e sonhar com a sua linda poesia. Sempre disse que tinhas de mostrar ao

mundo esse teu outro talento! Obrigada Cátia Marques pelos ensinamentos, simpatia e disponibilidade, sempre presentes.

Um enorme abraço de gratidão aos meus pais, por me ajudarem a ultrapassar todas as etapas da minha vida com força e sucesso, por me fazerem ser a pessoa que sou, pelo amor, carinho e amizade eternos. A vocês devo a minha vida e todo o meu percurso académico. Obrigada pai, meu companheiro de vida, pelo gigante apoio que me deste na entrada para o curso que mais amo na vida, Medicina Veterinária.

Obrigada Nelson, meu grande amor e companheiro de vida, por todos os momentos excelentes e menos bons das nossas vidas, por poder sempre contar contigo para tudo.

Aos meus queridos colegas que me acompanharam durante o estágio, que me deram esperança e ajuda nos pontos baixos e altos desta minha jornada.

Obrigada meus amigos, Joana Mendes, Valdo Monteiro, Bárbara Marques, Ana Ferreira, Rita Ramalho, Rita Lousada, Pedro Silveira, Tiago Pinto, Gonçalo Neto, Catarina Duarte, Margarida Soares, Fernanda Cipriano e Joana Correia. Obrigada Patrícia Gomes, minha amiga e companheira de tema de tese.

Obrigada a todos os meus colegas que me acompanharam nestes cinco anos deste nosso lindo curso, com muita persistência, alegria, muitas horas mal dormidas e muitas vitórias e conquistas. “Tudo vale a pena quando a alma não é pequena” (Fernando Pessoa).

À minha querida colega e amiga Cristina Costa obrigada pelas nossas brincadeiras, longas conversas e desabafos. Estás no meu coração. À minha amiga Lara Pires, obrigada por tudo, tu arrasas em tudo o que te propões fazer! À minha “maninha” Rita Costa um obrigada do tamanho da nossa amizade. És fantástica e o “nós” é para a vida! Ao meu grande amigo e companheiro de aventuras Tiago Correia, obrigada por tudo o que me dás. Adoro-vos!

Muito obrigada a todos os proprietários dos animais que disponibilizaram os seus animais a entrar para o estudo, sem eles este estudo não era possível.

A toda a minha família e restantes amigos, um grande abraço e obrigada por fazerem parte da minha vida. A todos os meus futuros colegas de profissão e amigos, muita força e sucesso!

“Veterinária cilindra!!!”. “Veterinária cilindra!!!”. “Veterinária cilindra!!!”

Resumo

A infeção por *Leishmania infantum* no cão tem adquirido ao longo dos anos uma maior importância no nosso País e a uma escala mundial, sendo Leishmaniose visceral zoonótica endémica em Portugal.

Este estudo foi realizado numa amostra de 39 cães assistidos no Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa e teve como objetivos: 1. Comparação da eficácia de duas técnicas serológicas (IFI e ELISA) para a deteção de anticorpos anti-*Leishmania* em quatro grupos de cães, a saber: A - Cães com Leishmaniose e simultaneamente infetados com agentes de outras doenças caninas transmitidas por vetores; B - Cães doentes com outras afeções - Doenças dermatológicas, Alterações oculares, Infeções Bacterianas, Tumores, Doenças endócrinas e DCTV (Babesiose, Erlichiose, Rickettsiose, excluindo Leishmaniose); C - Cães clinicamente saudáveis; D - Cães com Leishmaniose (com ou sem outras afeções); 2. Pesquisa de DNA de *L. infantum* pela técnica molecular qPCR em amostras de pele, nos quatro grupos de cães acima referidos; 3. Avaliar se diferentes doenças e estados clínicos influenciam o resultado de técnicas de diagnóstico para deteção de *L. infantum*; 4. Determinação da influência de fatores de risco como o sexo, a idade, o porte, a pelagem, o local de habitação, o concelho de residência, entre outros, na positividade para *L. infantum*.

Através do uso das técnicas serológicas de IFI e ELISA, no grupo A, obtiveram-se resultados positivos em ambas as técnicas para os 7 animais (7/7); nos grupos B e C, resultados negativos em ambas as técnicas para os 20 animais (20/20) e no grupo D, pela técnica de IFI, resultados positivos (7/12), negativos (4/12) e duvidosos (1/12). Para este mesmo grupo, pela técnica de ELISA, obtiveram-se resultados positivos (10/12) e negativos (2/12). Através da técnica molecular de qPCR, no grupo A obtiveram-se 6 resultados positivos (6/7); no grupo B, 8 resultados negativos (8/10); no grupo C, 9 resultados negativos (9/10) e no grupo D, 7 resultados negativos (7/12). O fator “época do ano” em que os animais se deslocava por Portugal, teve um valor de $p < 0,05$, estatisticamente significativo na positividade para *L. infantum*, no grupo D e relativamente à técnica de qPCR.

Palavras chaves: *Leishmania infantum*, cão, IFI, ELISA, qPCR, Leishmaniose, factores de risco

Abstract

Over the years, *Leishmania infantum* infection in dogs has gained a growing importance, both in our country and Worldwide being Zoonotic visceral leishmaniosis endemic in Portugal.

A sample of 39 dogs attended at Teaching Hospital of Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa was study aiming, with the following objectives: 1. To compare the performance of two serological techniques (IFAT and ELISA) for the detection of anti-*Leishmania* antibodies among four groups of dogs: A - Dogs with leishmaniosis and concurrent infection with other canine vector borne diseases agents; B - Dogs with certain afecctions - Dermatological diseases, ocular changes, bacterial infections, tumors, endocrine disorders, CVBD (Babesiosis, Ehrlichiosis, Ricktesiosis, excluding leishmaniosis); C - Clinically healthy dogs; D - Dogs with leishmaniosis (with or without other afecctions); 2. To detect *L. infantum* DNA by qPCR in skin samples obtained from the four groups; 3. To evaluate whether different diseases and clinical conditions interfere, or not, with the results of *L. infantum* infection diagnostic techniques; 4. Evaluate the influence of risk factors, such as gender, age, size, coat, habitat, residency county, among others, in the positiveness for *L. infantum*.

Through the use of the serological techniques IFAT and ELISA, positive results were observed by both techniques in the seven animals (7/7); in groups B and C, there were negative results in both techniques in the 20 animals (20/20) and in group D, with IFAT, there were observed positive (7/12), negative (4/12) and doubtful results (1/12). In this same group, with ELISA technique, there were obtained positive (10/12) and negative (2/12) results. With the molecular assay qPCR, in group A there were obtained 6 positive results (6/7); in group B, 8 negative results (8/10); in group C there were 9 negative results (9/10) and in group D, there were 7 negative results (7/12), In group D, regarding qPCR technique, the risk factor “season of the year” when the animals traveled trough Portugal had a statistically significant influence (p value < 0,05) in the positiveness for *L. infantum* infection.

Key words: *Leishmania infantum*, dog, IFAT, ELISA, qPCR, Leishmaniasis, risk factors

ÍNDICE GERAL

Agradecimentos	ii
Resumo	iv
Abstract	v
Índice Geral	vi
Índice de Abreviaturas	ix
Índice de Figuras.....	xi
Índice de Tabelas.....	xii
Índice de Gráficos.....	xiii
Capítulo I – Introdução	1
1. Descrição das atividades efetuadas no estágio curricular	1
1.1. Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária (HEFMV) – Universidade de Lisboa (ULisboa).....	1
1.1.1. Medicina Interna	1
1.1.2. Cirurgia	4
1.1.3. Imagiologia	5
1.1.4. Internamento	6
1.2. Laboratório de Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa	6
1.3. Laboratório de Virologia da Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa	6
Capítulo II – Revisão Bibliográfica sobre Leishmaniose Canina e outras doenças caninas transmitidas por vetores.....	7
1. Introdução	7
2. Etiologia e Caracterização do Agente	8
3. Hospedeiros	9
3.1. Vertebrados	9
3.2. Vetores	10
4. Ciclo Biológico de <i>Leishmania</i> sp.	11
5. Epidemiologia e Principais Vias de Transmissão	12
5.1. Epidemiologia de Leishmaniose Canina em Portugal	13
6. Patogenia e Lesões	14
6.1. Patogenia	14
6.2. Lesões	15
7. Resposta Imune	15
7.1. Celular	16
7.2. Humoral	17

8. Diagnóstico.....	18
8.1. Diagnóstico Clínico.....	18
8.1.1. Apresentações clínicas.....	18
8.1.2. Anamnese e Exame Físico.....	18
8.1.3. Alterações no hemograma, análises bioquímicas e urianálise.....	20
9. Insuficiência Renal Crônica e Leishmaniose canina.....	20
10. Diagnóstico Laboratorial.....	22
10.1. Diagnóstico Parasitológico.....	22
10.2. Diagnóstico Serológico.....	22
10.2.1. Imunofluorescência Indireta (IFI).....	23
10.2.2. Ensaio Imunoenzimático (ELISA).....	24
10.2.3. Outros – Contraímuno eletroforese (CIE), Teste de Aglutinação Direta (TAD), Western Blot (WB).....	25
10.3. Diagnóstico Molecular.....	26
10.3.1. qPCR.....	26
10.3.2. Tipos de PCR modificados.....	27
10.4. Outras Técnicas de Diagnóstico.....	27
10.4.1. Teste de Montenegro.....	27
10.4.2. Xenodiagnóstico.....	28
11. Tratamento.....	28
11.1. Terapêutica Farmacológica.....	29
11.1.1. Monoterapia.....	29
11.1.2. Politerapia.....	31
11.2. Terapêutica Sintomática.....	31
12. Estadiamento clínico da Leishmaniose Canina - I a IV.....	31
13. Prognóstico.....	32
14. Medidas de Controlo.....	32
15. Impacto das Leishmanioses na Saúde Pública.....	33
16. Babesiose Canina.....	34
16.1. Etiologia, Epidemiologia, Patogenia e Ciclo de Vida.....	34
16.2. Sinais Clínicos, Diagnóstico e Tratamento.....	34
17. Ehrliquiose Monocítica Canina.....	35
17.1. Etiologia, Epidemiologia, Patogenia e Ciclo de Vida.....	35
17.2. Sinais Clínicos, Diagnóstico e Tratamento.....	36
18. Febre Botonosa Canina.....	37
18.1. Etiologia, Epidemiologia, Patogenia e Ciclo de Vida.....	37
18.2. Sinais Clínicos, Diagnóstico e Tratamento.....	38

Capítulo III– Avaliação de duas técnicas serológicas (IFI e ELISA) e uma técnica molecular (qPCR em amostra de pele) no diagnóstico de infecção por <i>Leishmania infantum</i> em cães	39
1. Objetivos.....	39
2. Material e Métodos.....	39
2.1. Caracterização da amostra.....	39
2.2. Colheita e conservação das amostras.....	40
2.3. Métodos de diagnóstico	40
2.3.1. Técnicas sorológicas.....	40
2.3.1.1. Pesquisa de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> por IFI.....	40
2.3.1.2. Pesquisa de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> pela técnica de ELISA.....	42
2.3.2. Técnicas moleculares.....	44
2.3.2.1. Pesquisa de DNA de <i>Leishmania infantum</i> em amostras de raspagem cutânea pela técnica molecular de qPCR	44
2.4. Análise estatística dos resultados.....	47
3. Resultados.....	48
3.1. Caracterização da amostra de acordo com as respostas obtidas no inquérito realizado aos proprietários dos cães e exames complementares de diagnóstico.....	48
3.2. Resultados obtidos na pesquisa de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> por IFI.....	61
3.3. Resultados obtidos na pesquisa de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> pela técnica de ELISA.....	62
3.4. Resultados obtidos na pesquisa de anticorpos anti- <i>Leishmania infantum</i> pela técnica de qPCR.....	63
3.5. Resultados da análise estatística efetuada.....	64
4. Discussão.....	68
5. Conclusão.....	87
Capítulo IV - Bibliografia.....	88
Capítulo V - Anexos.....	104

Índice de Abreviaturas

°C – Graus Celsius	Ig - Imunoglobulina
% - Percentagem	IL 2 - Interleucina 2
> - Aumento	IRC - Insuficiência Renal Crónica
µL - microlitro	IRIS - “International Renal Interest Society”
Ac - Anticorpo	LCan - Leishmaniose Canina
Ag - Antigénio	LCV - Leishmaniose Canina Visceral
AGC - Anaplasmosse Granulocítica Canina	LCut - Leishmaniose Cutânea
ALT – Alanina amino-transferase	LFel - Leishmaniose Felina
A. M - Antimoniato de Meglumina	LHum - Leishmaniose Humana
AST – Aspartato amino-transferase	Ln - Linfonodo
BID - Duas vezes ao dia	LVZ - Leishmaniose Visceral Zoonótica
Bq - bioquímica	MIMV - Mestrado Integrado em Medicina Veterinária
BUN - “blood urea nitrogen”; ureia	mL - mililitro
cPCR - PCR convencional (do inglês conventional PCR)	mg - miligrama
Crea - creatinina	Nº - Número
DNA - Ácido desoxirribonucleico (do Inglês Deoxyribonucleic acid)	OMS - Organização Mundial de Saúde
EMC - Ehrlichiose Monocítica Canina	PO - Via oral (<i>per os</i>)
EUA - Estados Unidos da América	PBS - Tampão fosfato-salino (do Inglês “Phosphate buffered saline”)
ELISA - Ensaio Imunoenzimático (do Inglês Enzyme-linked immunosorbent Assay)	PAAF - Punção aspirativa por agulha fina
FAS - Fosfatase alcalina	PTs - proteínas totais
FeLV - Vírus da Leucemia Felina (do Inglês “Feline Leukaemia Virus”)	PI - Período de Incubação
FIV - Vírus da Sida Felina (do Inglês “Feline Immunodeficiency Virus”)	qPCR - Reação em cadeia da polimerase em tempo real (do Inglês “quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction”)
FMV - ULisboa - Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa	PAAF - Punção aspirativa por agulha fina
FN - Falso negativo	PTs - proteínas totais
FP - Falso positivo	PI - Período de Incubação
HEFMV - Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária	qPCR - Reação em cadeia da polimerase em tempo real (do Inglês “quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction”)
IFI - Imunofluorescência indireta	RNA - Ácido ribonucleico (do Inglês “Ribonucleic acid”)
IFN - Interferão	

Rx - Raio X

SID - Uma vez ao dia

SFM - Sistema Fagocítico Mononuclear

SRD - sem raça determinada

TID - Três vezes ao dia

TTA - Tibial Tuberosity Advancement

TPLO - Tibial Plateau Leveling Osteotomy

Índice de Figuras

Figura 1 – Cão com Demodicose (original).	3
Figura 2 - Útero com conteúdo purulento (piómetra fechada) (original).....	3
Figura 3 – (A) Formas promastigotas do parasita <i>L. infantum</i> em meio de cultura, coloração Giemsa (Lâmina gentilmente cedida pela Dr ^a Lídia Gomes), (B) Formas amastigotas dentro de macrófagos de um cão Infetado, coloração Giemsa (Lâmina gentilmente cedida pela Dr ^a Lídia Gomes).....	8
Figura 4 – <i>Phlebotomus</i> sp.....	10
Figura 5 – Distribuição de LCan na Europa.....	12
Figura 6 – Cão com sinais clínicos de Leishmaniose.	19
Figura 7 – Epistáxis unilateral.	19
Figura 8 – Ulceração muco-cutânea.....	19
Figura 9 – Principais sinais clínicos associados a LCV: (A) Hifema e edema da córnea, (B) Dermatite com queratoconjuntivite e hiperqueratose, (C) Glaucoma em estadio avançado, (D) Linfadenomegália do linfonodo poplíteo, (E) Caquexia, (F) Onicogribose.....	19
Figura 10 - Kit Leishmania - Spot IF (Laboratório bioMérieux [®] , França).....	42
Figura 11 - Microplaca de titulação.	42
Figura 12 - Lâminas com antígeno fixado, antes da incubação.....	42
Figura 13 - Olympus DP10, Modelo BX50F.	42
Figura 14 - Kit LEISCAN [®] LEISHMANIA ELISA TEST.	43
Figura 15 - Conjunto de reagentes pertencentes ao kit LEISCAN [®] LEISHMANIA ELISA TEST.	44
Figura 16 - Aspeto dos poços já com a solução de Paragem adicionada (Passo 10).	44
Figura 17 - Espectrofotómetro com monocromador da marca SPECTRA MAX [®] , modelo 340 PC (Passo 11).	44
Figura 18 - Interpretação dos resultados do kit LEISCAN [®] LEISHMANIA ELISA TEST.....	44
Figura 19 - Aspeto de um controlo positivo para <i>Leishmania</i> spp.....	61
Figura 20 - Aspeto de um controlo positivo para <i>Leishmania</i> spp.....	61

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Casuística observada de acordo com a Especialidade.....	2
Tabela 2 - Taxonomia do género <i>Leishmania</i> sp.....	8
Tabela 3 - Taxonomia do vetor de <i>Leishmania</i> sp.	10
Tabela 4 - Estadiamento da Insuficiência Renal Crónica canina.....	21
Tabela 5 - Sub-estadiamento de IRC canina com base no rácio UPC.....	21
Tabela 6 - Sub-estadiamento de IRC canina com base na pressão arterial.....	21
Tabela 7 - Estadiamento clínico de LCan com base na sorologia, sinais clínicos, dados laboratoriais, esquema terapêutica e prognóstico.....	32
Tabela 8 - Diluições seriadas do controlo positivo [plasmídeo recombinante pGEM® (Promega, Portugal)] e os respectivos valores de C _T	46
Tabela 9 - Distribuição dos animais por grupos e por raça.....	49
Tabela 10 - Resultados obtidos pela técnica de IFI.....	62
Tabela 11 - Resultados obtidos pela técnica de ELISA.....	62
Tabela 12 - Resultados obtidos pela técnica de qPCR.....	63
Tabela 13 - Resultados da carga parasitária (cópias/μL) dos quatro grupos de cães testados pela técnica de qPCR.....	64
Tabela 14 - Resultados do Teste de Fischer aplicado às duas técnicas de diagnóstico, por grupos, testando a hipótese nula (H ₀ - IFI vs. ELISA independentes).....	64
Tabela 15 - Resultados da aplicação da ferramenta EpiTools (AusVet Animal Health Services®) à técnica de IFI e ELISA, por grupos.....	65
Tabela 16 - Resultados do Teste de Fischer, relacionando diversos fatores de risco para a infeção por <i>Leishmania</i> com os resultados obtidos pelas três técnicas de diagnóstico em cada grupo.....	66
Tabela 17 - Distribuição dos animais do Grupo D que viajam pelo país, pela época do ano em que o efetuam.....	67
Tabela 18 - Resultados da aplicação do Teste de Fischer aos quatro grupos, relacionando os vários fatores de risco com a “Avaliação da Especificidade de ELISA”	67

Índice de Gráficos

Gráfico 1 - Distribuição das consultas assistidas, por especialidade (N=410).....	3
Gráfico 2 - Distribuição dos exames complementares (N=364).	4
Gráfico 3 - Distribuição dos animais assistidos nas consultas, de acordo com a idade e espécie (N=410).....	4
Gráfico 4 - Número de cirurgias observadas, dispostas por categoria (N=180).....	5
Gráfico 5 - Reação de qPCR com as curvas standard das diluições seriadas do plasmídeo e os seus respetivos valores de C_T	47
Gráfico 6 - Reta padrão elaborada a partir de diluições seriadas de plasmídeo e respetivas reações de qPCR. É apresentada a respetiva equação da reta e o coeficiente de determinação (R^2), assim como o desvio padrão de cada ponto.....	47
Gráficos 7,8,9,10 - Frequência relativa (%) da distribuição dos animais por grupos e por sexo.....	48
Gráficos 11,12,13,14 - Frequência relativa (%) da distribuição dos animais por grupos e por faixa etária.....	49
Gráficos 15,16,17,18 - Frequência relativa (%) da distribuição dos animais por grupos e por comprimento da pelagem.....	50
Gráficos 19,20,21,22 - Frequência relativa (%) da distribuição dos animais por grupos e por porte.....	51
Gráficos 23,24,25,26 - Frequência relativa (%) da distribuição dos animais por grupos e por proveniência.....	51
Gráficos 27,28,29,30 - Frequência relativa (%) da distribuição dos animais por grupos e por local de habitação.....	52
Gráficos 31,32,33,34 - Frequência relativa (%) da distribuição dos animais por grupos e por Concelho de residência.....	53
Gráficos 35,36,37,38 - Frequência relativa (%) da distribuição dos animais por grupos e por nº de passeios diários.....	54
Gráficos 39,40,41,42 - Frequência relativa (%) da distribuição dos animais por grupos e coabitação com outros animais.....	54
Gráficos 43,44,45,46 - Frequência relativa (%) da distribuição dos animais por grupos quanto à deslocação por Portugal.....	55
Gráficos 47,48,49,50 - Frequência relativa (%) da distribuição dos animais por grupos e tipos de desparasitação externa.....	56
Gráficos 51,52,53,54,55,56,57,58 - Frequência relativa (%) da distribuição dos animais por grupos, relativamente a uma desparasitação externa administrada corretamente.....	57

Gráficos 59,60,61,62 - Frequência relativa (%) da distribuição dos animais por grupos, quanto ao modo como os seus proprietários efetuam a desparasitação interna.....	58
Gráfico 63,64,65,66 - Frequência relativa (%) por grupos de animais, quanto à opinião dos proprietários acerca da realização ou não da prevenção contra Leishmaniose.....	59
Gráfico 67,68,69,70 - Frequência relativa (%) por grupos de animais, relativamente à familiaridade dos proprietários para com Leishmaniose.....	59
Gráfico 71,72,73,74 - Frequência relativa (%) dos animais com IRC.....	60

1. Descrição das atividades efetuadas no estágio curricular

O estágio curricular da autora decorreu no Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária (HEFMV) – Universidade de Lisboa (ULisboa), e como tema de dissertação da Tese de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, foi escolhido um tema (Leishmaniose e técnicas de diagnóstico) do seu grande interesse. Também pelo facto de constituir uma das principais doenças dos canídeos, com grande importância em Medicina Veterinária e em Saúde Pública.

1.1. Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária (HEFMV) – Universidade de Lisboa (ULisboa)

O estágio curricular tomou lugar no HEFMV – ULisboa, no período de 9 de setembro de 2013 a 28 de fevereiro de 2014, com a duração total de 1208 horas, tendo contactado com as áreas de Consulta Externa/Medicina Interna, Cirurgia, Imagiologia e Internamento. Simultaneamente permaneceu diversas horas no Laboratório de Doenças Parasitárias e no Laboratório de Virologia da Faculdade de Medicina Veterinária - ULisboa.

1.1.1. Medicina Interna

Na área da Medicina Interna, onde permaneceu durante dois meses e três semanas (total de 336 horas), teve contacto com as seguintes áreas: Oftalmologia, Estomatologia, Gastroenterologia, Nefrologia/Urologia, Neurologia, Ortopedia, Dermatologia, Reprodução e Obstetrícia, Cardiologia, Oncologia, D. Infeciosas/Parasitárias, Toxicologia, Endocrinologia, Pneumologia, Medicina Preventiva, Reavaliações e outros, em pequenos animais e novos animais de companhia/exóticos.

Teve a oportunidade de assistir e participar em inúmeras consultas, nas quais os médicos responsáveis pediam inicialmente para chamar o animal à sala de espera e iniciar a consulta realizando a história pregressa e exame físico. No decorrer das consultas, procedia à contenção, colheita de amostras biológicas como sangue, urina, etc, e a alguns exames complementares de diagnóstico e por fim discutiam-se os diagnósticos diferenciais e terapêutica instituída. Caso se tratasse de um animal a requerer cuidados continuados, encaminhava-o ao internamento.

Assistiu e auxiliou diversas consultas pré-cirúrgicas relativas aos vários tipos de cirurgia e várias consultas de especialidade (Tabela 1).

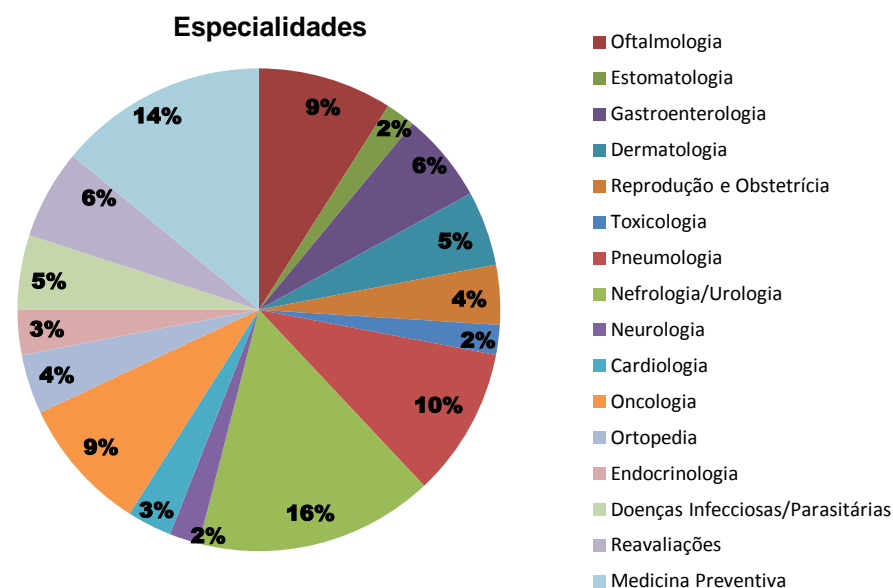
Tabela 1 - **Casuística observada de acordo com a Especialidade.**

Especialidade	Casuística observada
Cirurgia - Tecidos Moles	Resolução de otohematomas, ovariectomias em cadela/gata (Figura 2), exérese de nódulos, exodontia e destartarizações, herniorrafias diafragmáticas/perineais/inguinais.
Cirurgia Ortopédica	TTA, TPLO, osteotomia da cabeça do fêmur, osteossíntese de ossos longos, hemilaminectomia, resolução de luxação patelar, osteossíntese da mandíbula, amputação de dígitos.
Oftalmologia	Cataratas, queratoconjuntivite seca, queratites, úlceras da córnea, glaucoma, entropion/ectropion, prolapso da glândula da membrana nictitante, disfunção das Glândulas de Meibomius, uveíte hipertensiva.
Estomatologia	Doença periodontal, persistência de dentes decíduos, abscesso do dente carniceiro, granuloma eosinofílico associado a infecção por FIV/FeLV.
Gastroenterologia	Obstrução por corpo estranho, obstipação, torsão de estômago, invaginação intestinal, megaesôfago, colite/enterocolite, Sobrecrecimento bacteriano (SIBO), gastroenterites provocadas por Parvovirus/ indiscrição alimentar.
Nefrologia/Urologia	Urolitíase, infecção trato urinário, cistite idiopática felina, insuficiência renal aguda e crônica, hidronefrose e hidroureter, hipoplasia e hiperplasia renal.
Neurologia	Síndrome vestibular, síndrome de Wobbler, hérnia discal com quadro de para/tetraparésia.
Dermatologia	Demodicose (Figura 1), Sarna (sarcóptica/otodécica), alergia alimentar, dermatite alérgica à picada da pulga, alergia ambiental.
Reprodução	Piômetra, pseudogestação, interrupção de gestação, vaginite, endometrite, hiperplasia benigna da próstata, prostatite, orquite, parafimose com balanopostite.
Cardiologia	Insuficiência valvular (mitral e/ou tricúspide), endocardite, endocardiose/estenose da válvula mitral/tricúspide, derrame pericárdico com tamponamento cardíaco, insuficiência cardíaca congestiva, cardiomiopatia dilatada/hipertrofica, tromboembolismo aórtico.
Oncologia	Neoplasias em diversos locais e de diferentes origens e graus de malignidade (lipomas/lipossarcomas, mastocitomas, carcinomas espinocelulares, carcinomas mamários, linfomas, osteossarcomas, hemangiossarcomas, metastizações peritoneais/pulmonares, pólipos/neoplasias nasais afetando as coanas e o espaço retrobulbar).
Doenças Infeciosas e Parasitárias	Leptospirose, traqueobronquite infecciosa canina, parvovirose e panleucopénia felina, FIV, FeLV, calicivirus+ herpesvirus, leishmaniose, ehrlichiose, babesiose, rickettsiose, dirofilariose.
Toxicologia	Intoxicação de gatos por paracetamol/etilenoglicol, intoxicações de cães por ingestão de dicumarínicos/detergentes/plantas aliáceas.
Endocrinologia	Diabetes mellitus, hipotireoidismo em cão, hipertireoidismo em gato, hipo/hiperadrenocorticismos em cão.
Pneumologia	Pneumonia, pneumotórax, piotórax, colapso da traqueia, traqueíte associada a alérgenos ambientais.

Ao nível da Medicina preventiva assistiu a ações de profilaxia como desparasitações externas e internas, vacinações, recomendações nutricionais. Existiram bastantes consultas a animais jovens, acompanhados pela primeira vez por um médico veterinário, onde se

aconselhou o proprietário do animal relativamente ao maneio (alimentação, desparasitação, vacinação, banho, corte de unhas, higiene, educação comportamental).

Gráfico 1 – Distribuição das consultas assistidas, por especialidade (N= 410).



A população consultada nestes seis meses incluiu cães, gatos e animais exóticos (pequenos mamíferos, répteis e aves). No geral houve maior afluência de cães à consulta do que de gatos e animais exóticos. Relativamente aos animais exóticos observaram-se casos de abscessos/neoplasias diversos nos pequenos mamíferos e serpentes, má oclusão dentária e anorexia em roedores, aspergilose e sarna em aves.

Durante o período de estágio a autora realizou também diferentes pensos, colocou catéteres, colheu amostras biológicas (sangue, urina, pele, biópsias variadas), processou amostras sanguíneas e urinárias, interpretou análises hematológicas, bioquímicas e urianálises e inteirou-se do programa informático (QVet).

Nesta área teve também a oportunidade de assistir ou realizar diversos exames complementares de diagnóstico (Gráfico 2).

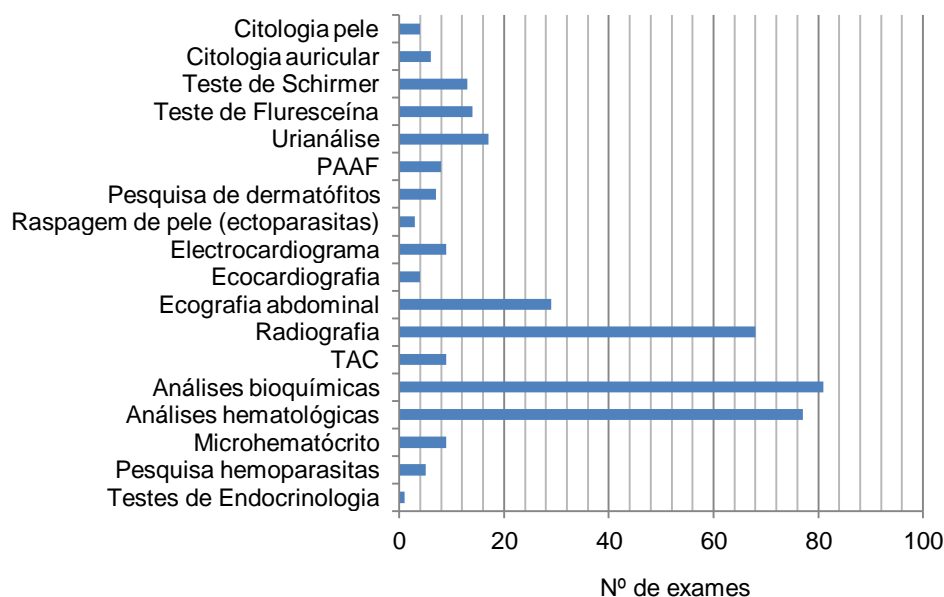
Figura 1 – Cão com Demodicose (original).



Figura 2 – Útero com conteúdo purulento - piómetra fechada (original).

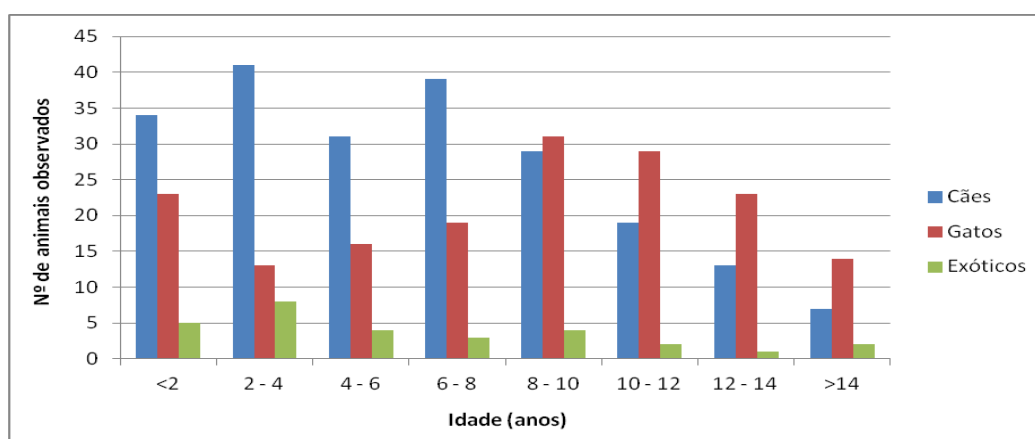


Gráfico 2 – Distribuição dos exames complementares (N=364).



No total acompanhou aproximadamente cerca de 410 consultas. A população de animais consultada consistiu em 213 cães (52%), 168 gatos (41%) e 29 animais exóticos (hamsters, ratazanas, gerbilos, cobaios, furões, chinchilas, coelhos, aves, serpentes, tartarugas) (7%) (Gráfico 3).

Gráfico 3 – Distribuição dos animais assistidos nas consultas, de acordo com a idade e espécie (N=410).

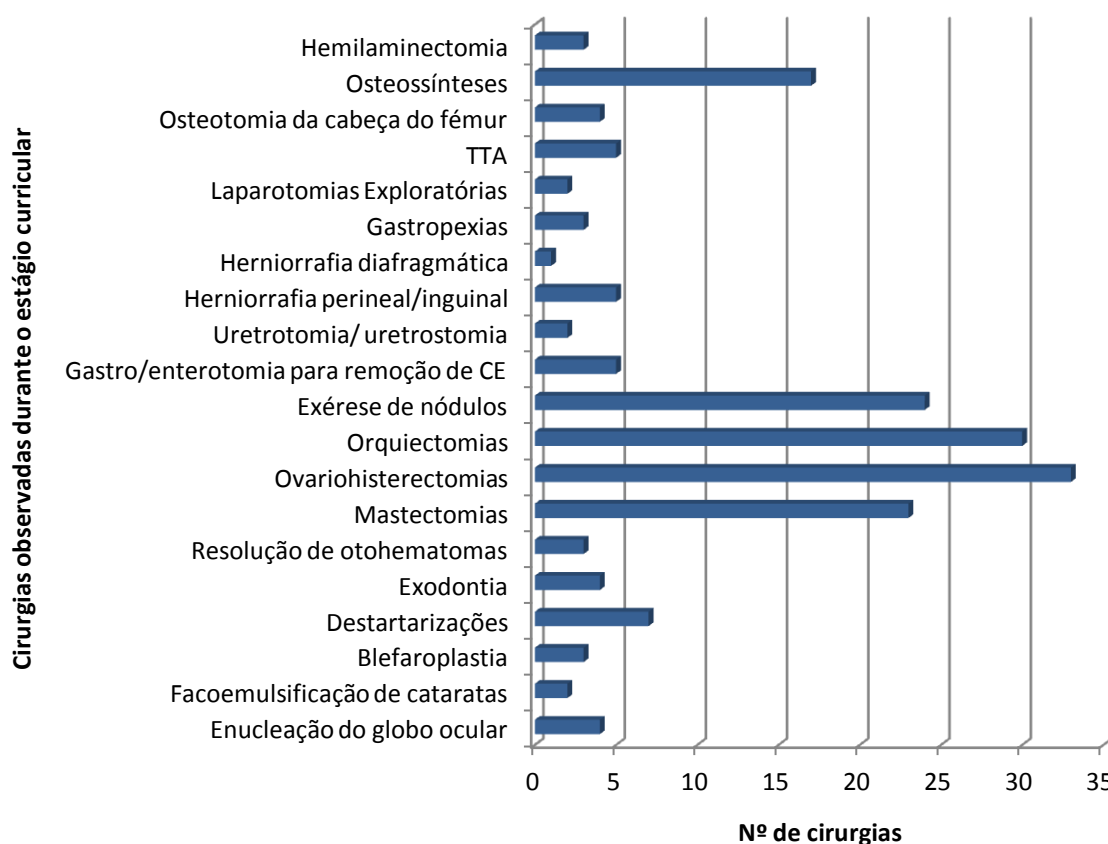


1.1.2. Cirurgia

Na área de Cirurgia, na qual permaneceu dois meses e três semanas (total de 360 horas), realizou diversas durante período pré-operatório, nomeadamente colocação de catéteres, sedação e intubação, preparação de medicação injetável, preparação do animal para a cirurgia (tricotomia e desinfecção cuidada do campo cirúrgico). Transporte para o bloco operatório e depois de realizada a cirurgia, fazer o penso, acordar o animal da anestesia e monitorizar o período pós-operatório.

Participou em inúmeras cirurgias como ajudante de cirurgião ou apenas monitorizando a anestesia volátil. Como existiu bastante casuística, a autora teve a oportunidade de realizar autonomamente várias orquiectomias a cães/gatos, extrair e destartarizar dentes de cães/gatos e realizar uma grande quantidade de suturas (intradérmicas, em X e simples). Nas cirurgias de tecidos moles e ortopedia, observou/participou de algum modo na resolução dos problemas pré-cirúrgicos referidos anteriormente na Tabela 1. A população submetida a cirurgia foi constituída por 97 cães (54%), 72 gatos (40%) e 11 animais exóticos (gerbilos, ratazanas, cobaios, chinchilas, coelhos, aves) (6%). No total assistiu e/ou participou a cerca de 180 cirurgias (Gráfico 4).

Gráfico 4 – Número de cirurgias observadas, dispostas por categoria (N=180).



1.1.3. Imagiologia

Nesta área, a autora auxiliou e acompanhou um grande número de Radiografias, Tomografias Axiais Computorizadas (TAC), ecografias abdominais e ecocardiografias. Aqui despendeu duas semanas (total de 80 horas) em horário alternado e mesmo enquanto permaneceu em Medicina Interna também se efetuavam Rx durante as consultas, com posterior discussão dos resultados entre o médico veterinário assistente e os proprietários do animal. No número total de horas, estes não foram contemplados.

Nesta área teve a oportunidade de conhecer o funcionamento do aparelho de raio-X, efetuar o posicionamento do animal, revelar a imagem radiográfica e participar na sua interpretação.

A casuística foi vasta e abrangeu situações de fraturas de membros/bacia/mandíbula/maxilar/costelas, luxações de membros, ruturas de ligamentos, casos de displasia coxo-femoral, colocação de tubos esofágicos e nasogástricos, casos de pneumotórax, derrames pleurais, casos de ascite, torções gástricas e/ou esplênicas, obstruções intestinais por CE, invaginações intestinais, diversas neoplasias (hepáticas, mediastínicas, mesentéricas, nasais, etc), organomegalias (rim, baço, fígado, coração, etc), megaesófago, colapso da traqueia, estenose esofágica, metastizações pulmonares de tumores mamários, entre outros.

1.1.4. Internamento

No total realizou 432 horas de internamento durante o seu estágio, as quais foram divididas em turnos de vinte e quatro horas cada. Nestes, participou na alimentação, cuidados de higiene e sanidade animal, administração de terapêutica em conformidade com os protocolos instituídos e colheita de amostras biológicas e outros exames complementares.

Durante cada turno assegurava a alimentação às horas estipuladas, assim como terapêuticas instituídas, passeava os cães na rua, monitorizava todos os animais internados ou em pós-cirúrgico sempre que estipulado ou necessário. Na alimentação dos animais cada um tinha especificado o tipo de alimento, húmido ou ração seca e as horas da alimentação. Na medicação a administrar, tinha-se em conta o horário, a frequência diária (SID/BID/TID), a via de administração e a correta contenção do animal. Relativamente à monitorização de cada animal, avaliava-se a temperatura corporal, frequências cardíaca e respiratória, pulso, tonalidade das mucosas, tempo de repleção capilar e quando necessário a glicémia para posteriores curvas de glicémia. Em todos os turnos eram mudadas as camas dos animais as vezes que fossem necessárias.

Diversas vezes entregou o animal, ao final do dia e com alta passada, ao seu proprietário e explicou a terapêutica a instituir em casa.

1.2. Laboratório de Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa

Neste local, a autora executou as técnicas de Imunofluorescência Indireta (IFI) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA), desde a preparação dos reagentes à interpretação dos resultados, com o auxílio da Dr^a Lúcia Gomes e da Prof^a Doutora Isabel Fonseca.

1.3. Laboratório de Virologia da Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa

Neste local a autora realizou extração de DNA com vista à posterior realização da técnica de qPCR.

Capítulo II – Revisão Bibliográfica sobre Leishmaniose Canina e outras doenças caninas transmitidas por vetores

1. Introdução

A Leishmaniose Canina (LCan) é causada por um protozoário flagelado designado por *Leishmania infantum*, denominação do Velho Mundo, ou pelo seu sinónimo no Novo Mundo, *Leishmania chagasi*, e é uma zoonose de grande importância e potencialmente fatal em regiões da Europa, África, Ásia e América. Num estudo realizado por Shaw, Langton & Hillman (2009), conclui-se que nos países não endémicos, como o Reino Unido, esta doença também constitui um problema devido à importação de cães doentes ou infetados para o país. Na Europa, todos os casos existentes de Leishmaniose cutânea e visceral devem-se ao protozoário *L. infantum*. O seu principal hospedeiro é o cão doméstico (Baneth *et al.*, 2008).

A leishmaniose, foi descrita, pela primeira vez, em canídeos da espécie *Canis familiaris* L. 1758, em 1908, na Tunísia, por Nicolle e Comte (Campino, 2002; Pereira, 2008).

Dentro do género *Leishmania*, trinta espécies infetam mamíferos e apenas vinte são patogénicas para os humanos. Destas vinte, dez também afetam o cão, sendo elas: *L. infantum*, *L. donovani*, *L. tropica*, *L. major*, *L. arabica*, *L. braziliensis*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. combiensis* e *L. peruviana*. A espécie com maior distribuição mundial é *L. infantum* (Ashford, 2000; Desjeux, 2004; Roze, 2013).

São descritas duas formas principais desta doença: a Zoonótica, a qual inclui animais domésticos/silváticos como hospedeiros reservatório no ciclo de transmissão, essencialmente em zonas rurais; e a Antroponótica, na qual o Homem é a única fonte de infeção para o vetor, que ocorre em locais urbanos com elevada densidade populacional (Desjeux, 2004; OMS, 2014). A Leishmaniose está relacionada com alterações ambientais como desflorestações, construção de barragens, sistemas de irrigação, entre outros (OMS, 2014). Afeta a população mais pobre do planeta e está associada a má nutrição, mau alojamento, deslocamento da população, um sistema imunitário fraco e falta de recursos.

De acordo com a última atualização feita em janeiro de 2014 pela OMS, sobre esta doença, estima-se que existam anualmente 1.3 milhões de casos novos e entre 20 000 a 30 000 mortes anuais.

Os parasitas infetam os macrófagos e multiplicam-se, sendo ingeridos pelos flebótomos quando estes se alimentam. No intestino do flebótomo, os protozoários multiplicam-se e atingem o aparelho bucal, local pelo qual são injetados num novo hospedeiro quando volta a haver novo ciclo de alimentação (Cox, 2002).

2. Etiologia e Caracterização do Agente

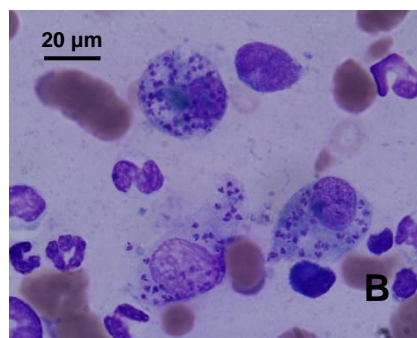
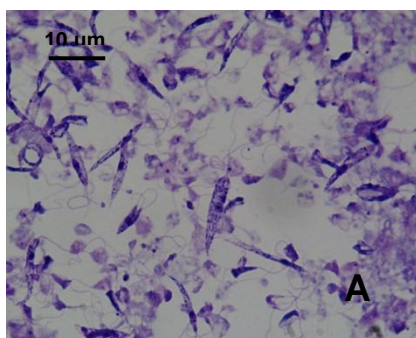
O género *Leishmania* apresenta a seguinte taxonomia (Tabela 2) e é um protozoário dimórfico caracterizado pela presença de um núcleo e um cinetoplasto intracelular, que corresponde ao DNA mitocondrial (Gramiccia, 2011). Durante o seu desenvolvimento passa por duas formas principais: promastigota que é extracelular e flagelado (flagelo longo inserido na região anterior), é a forma presente no intestino do inseto vetor; e amastigota que é intracelular e aflagelado, é a forma que parasita os macrófagos do mamífero hospedeiro (Tomás & Romão, 2008) (Figura 3).

Tabela 2 - Taxonomia do género *Leishmania* sp.

(Adaptado do site:
<http://www.cvbd.org>)

Reino	Animalia
Subreino	Protozoa
Filo	Sarcomastigophora
Subfilo	Flagellata/ Mastigophora
Classe	Zoomastigophora
Ordem	Kinetoplastida
Subordem	Trypanosomatina
Família	Trypanosomatidae
Género	<i>Leishmania</i>

Figura 3 – (A) Formas promastigotas do parasita *L. infantum* em meio de cultura, coloração Giemsa (Lâmina gentilmente cedida pela Dr^a Lídia Gomes), (B) Formas amastigotas dentro de macrófagos de um cão infetado, coloração Giemsa (Lâmina gentilmente cedida pela Dr^a Lídia Gomes).



A forma promastigota de aspeto fusiforme, mede cerca 15 x 30 µm e possui na sua região anterior, um flagelo livre extracelular, que pode atingir 20 µm de comprimento. O amastigota tem um formato ovoide, mede cerca de 2 x 4 µm podendo variar entre 2.5 – 6.8 µm de diâmetro, e o flagelo é rudimentar e não visível (Tomás & Romão, 2008; Gramiccia, 2011). A coloração habitualmente usada nas lâminas de microscopia é a Giemsa, que cora o cinetoplasto e o núcleo do parasita de uma cor violeta intensa (Figura 3).

Em Portugal, já foram descritos os zimodemes (conjuntos de isolados com o mesmo perfil isoenzimático) MON-1, MON-24, MON-29, MON-80 e MON-98 de *L. infantum* (Cardoso, *et al.*, 2002; Campino *et al.*, 2006). O principal responsável pela maioria dos casos de leishmaniose canina visceral (LCV) na Bacia Mediterrânica e o mais frequentemente isolado em cães (Cortes *et al.*, 2006).

O subgênero *L. (Leishmania)* pode ser dividido nalguns complexos de espécies. No Velho Mundo os principais complexos são o *L. donovani* (*L. infantum*, *L. donovani*), *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica*; e no Novo Mundo, o complexo *L. mexicana* (*L. mexicana*, *L. amazonensis* e *L. venezuelensis*). Pensa-se terem origem Africana (Momen & Cupolillo, 2000).

3. Hospedeiros

3.1. Vertebrados

Segundo Moreno & Alvar (2002), já desde o início do século XX que o papel do cão como hospedeiro reservatório está confirmado. Para estes autores, a presença de um ciclo silvático independente do ciclo doméstico é pouco provável, devendo ser considerado um ciclo peridoméstico (Pereira, 2008).

Na forma de leishmaniose visceral zoonótica (LVZ) existem dois ciclos: o doméstico, no qual o cão tem o papel predominante e o silvático ou peridoméstico, no qual os animais silvestres são os responsáveis pela transmissão do género *Leishmania*. O ciclo doméstico é mantido por cães domésticos, e o ciclo peridoméstico por cães errantes e canídeos silvestres, os quais parecem apresentar um sinantropismo progressivo e disseminar a infeção (Pereira, 2008). Há também a possibilidade de os ciclos domésticos e silváticos ocorrerem simultaneamente, envolvendo uma diferente espécie de hospedeiro reservatório primário (por exemplo, um hospedeiro doméstico e um silvático, respetivamente), com uma ligação entre os dois ciclos através de um inseto flebotomíneo comum (Quinnell & Courtenay, 2009). Um grande número de espécies animais silvestres e domésticos atuam como hospedeiros principais e reservatório de várias espécies de *Leishmania* sp. que também afetam o homem (Ashford, 2000), entre elas destaca-se o cão (*Canis lupus familiaris*) como hospedeiro reservatório principal (Gállego, 2004). De acordo com Abranches *et al.* (1998), o cão é considerado um bom hospedeiro reservatório, uma vez que existe sobreposição do habitat do homem e do cão e um frequente contacto com flebotomos zoo-antropofílicos. A forma de parasitismo, viscerocutânea, associada a elevadas taxas de infeção, é favorável à transmissão a partir do vetor, e além disso a LCan é uma doença de evolução crónica.

No Novo Mundo, podemos encontrar diversos mamíferos silvestres como hospedeiros reservatório de *L. infantum*: Opossum (*Didelphis* sp), Armadilho (família Dasypodidae), Preguiça-comum (*Bradypus variegatus*), Daimão-do-cabo (*Procyon capensis*), Raposa comum (*Vulpes spp.*), Lobo-cinzento (*Canis lupus*), Raposa-do-campo (*Dusicyon vetulus*), Cachorro do mato (*Speothos venaticus*); Porco-espinho do Brasil (*Coendu prehensilis*), Rato-negro (*Rattus rattus*); Morcego (*Carollia perspicillata*).

No Velho Mundo, encontram-se outros mamíferos silvestres, hospedeiros reservatório: Chacal-dourado (*Canis aureus*), Lobo-cinzento (*Canis lupus*), Raposa-vermelha (*Vulpes vulpes*), Raposa-das-estepes (*Vulpes corsac*), Chacal-dourado (*Canis aureus*), Feneco

(*Vulpes zerda*), Texugo-europeu (*Meles meles*), Gineta (*Genetta genetta*), Lince-ibérico (*Lynx pardinus*), Sacarrabos (*Herpestes ichneumon*); Foca-monge-do-mediterrâneo (*Monachus monachus*); Ratazana (*Rattus norvegicus*), Hamster Sírio (*Mesocricetus auratus*), Hamster-cinza (*Cricetulus migratorius*), Porco-espinho (*Hystrix* sp.), entre outros (Dantas-Torres & Brandão-Filho, 2006; Dantas-Torres, 2007; Pereira, 2008).

Recentemente, o cavalo e o gato também foram implicados na transmissão deste parasita. A infecção no gato doméstico (*Felis silvestris catus*) tem sido encontrada em regiões como Portugal, França, Espanha, Itália, Argélia, Brasil, Texas, América do Sul, Grécia, Suíça, entre outros (Coelho *et al.*, 2010; Trainor *et al.*, 2010). Ainda há poucos estudos efetuados neste animal e a sua categorização como hospedeiro reservatório permanece inconclusiva (Maia & Campino, 2011).

Também se descrevem casos de leishmaniose equina na Europa causados por *L. infantum* (Gramiccia & Gradoni, 2005; Rolão, Martins, João & Campino, 2005). A leishmaniose equina caracteriza-se pela presença de lesões cutâneas com acumulação massiva de parasitas e ausência de anticorpos específicos. Estes animais recuperam espontaneamente (Mancianti, 2004, citado por Pereira, 2008), pelo que parecem ter uma resposta clínica e imunológica resistente à infecção, concluindo-se que se tratam apenas de hospedeiros acidentais (Gramiccia & Gradoni, 2005).

3.2. Vetores

São insetos dípteros, de cor castanha ou acinzentada, que medem entre 2 a 3 mm, podendo atingir os 5 mm (Afonso & Alves-Pires, 2008; Léger & Depaquit, 2001; WHO, 2014) (Figura 4) e que apresentam a seguinte taxonomia (Tabela 3).

Figura 4 - ***Phlebotomus* sp.**
(Adaptado do site:
<http://www.livredeparasitas.com.pt>)



Tabela 3 - **Taxonomia do vetor de *Leishmania* sp.**
(adaptado de Melhorn, 2001; Maroli *et al.*, 2012;
“CVBD - Taxonomy” Bayer 2014)

Reino	Animalia
Filo	Arthropoda
Subfiló	Tracheata
Classe	Insecta
Subclasse	Pterygota
Ordem	Diptera
Subordem	Nematocera
Família	Phlebotomidae/Psychodidae
Subfamília	Phlebotominae/Psychodinae
Género	<i>Phlebotomus</i> , <i>Lutzomyia</i>

Dos vários géneros de vetores, dois têm importância médica e médico-veterinária, o género *Phlebotomus* no Velho Mundo, e o género *Lutzomyia*, no Novo Mundo (Gramiccia, 2011). Morfologicamente, permanecem muito próximos um do outro (Sharma & Singh, 2008). Nas regiões Mediterrâneas, os vetores confirmados de LHum e LCan pertencem ao género

Phlebotomus spp., subgênero *Larroussius* (Diptera, Psychodidae) (Bongiorno, Habluetzel, Khoury & Maroli, 2003). Algumas espécies de flebotomíneos transmitem exclusivamente uma espécie de *Leishmania* sp., enquanto outras transmitem várias espécies. A capacidade das diferentes espécies atuar como vetores parece relacionar-se com a capacidade dos promastigotas procíclicos se ligarem especificamente a locais do intestino do inseto, chamados ligantes (Gramiccia & Gradoni, 2011).

A distribuição destes insetos depende do tipo de vegetação, clima e composição dos solos. Têm maior atividade entre os 15 e os 28°C, associada a humidades relativas altas e ausência de chuva ou vento. Podem percorrer distâncias até 2.5 km, têm uma maior atividade crepuscular ou noturna e apresentam fototropismo positivo (Afonso & Alves-Pires, 2008). São mais ativos nos meses quentes, de abril a outubro (primavera ao Outono) (Greene, 2006), como em Portugal, já nas regiões tropicais e sub-tropicais o seu ciclo gonotrófico ocorre ao longo de todo o ano (Sharma & Singh, 2008).

Os machos e fêmeas são fitófagos, ingerindo sucos vegetais provenientes de plantas ou de outros insetos (afídeos) (Afonso & Alves-Pires, 2008). Apenas as fêmeas são hematófagas e potencialmente infetantes para um hospedeiro (Maroli *et al.*, 2012).

O ciclo de vida desenvolve-se no meio terrestre (formas preimaginais) e aéreo (forma adulta), em quatro fases. Existem quatro estádios de desenvolvimento larval holometabólicos, ocorrendo metamorfoses completas. Os locais naturais de ovopostura são geralmente solos húmidos, ricos em matéria orgânica, adequados para o desenvolvimento das formas preimaginais (Killick-Kendrick & Killick-Kendrick, 1999). As larvas alimentam-se de matéria orgânica em decomposição de origem animal/vegetal e desenvolvem-se em locais abrigados com temperaturas estáveis (abrigos de roedores, fissuras de paredes e muros). Segue-se a pupa, que tende para uma forma globosa com cerca de 3 mm e não se move, nem alimenta. Passados cinco a dez dias emerge o adulto (Afonso & Alves-Pires, 2008).

O acasalamento entre flebotomíneos ocorre pelo menos uma vez num ciclo, logo após a fêmea se ingurgitar, ao alimentar-se de um hospedeiro mamífero, preferencialmente um cão. A fêmea alimentando-se de reptéis ou aves, não ingurgita.

4. Ciclo Biológico de *Leishmania* sp.

O ciclo de vida é heteroxeno e composto por duas fases. A fase amastigota que se encontra dentro das células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) do mamífero hospedeiro, mais concretamente nos macrófagos; e a fase promastigota que se encontra no intestino, glândulas salivares e aparelho bucal do hospedeiro invertebrado (Gramiccia & Gradoni, 2007, 2011; Gluenz, Ginger, & McKean, 2010). A transmissão da infeção ocorre quando uma fêmea de flebotomo pica um mamífero e realiza uma refeição sanguínea. Esta, ao sugar o sangue de um animal infetado, ingere macrófagos contendo a forma amastigota,

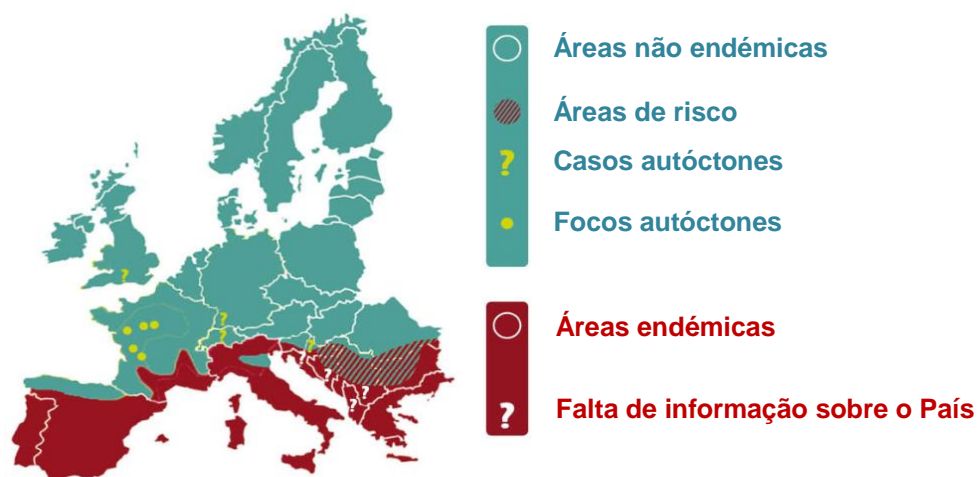
que por divisão binária se multiplicou em larga escala. Vai existir um processo de diferenciação no intestino do vetor que varia entre seis a dez dias (Tomás & Romão, 2008), ou apenas cinco dias de acordo com as espécies de *Leishmania* sp. e de *Phlebotomus* (Gramiccia & Gradoni, 2007), nos quais se diferenciam sucessivamente formas promastigotas procíclicos, nectomonas, metacíclicos, haptomonas e promastigotas metacíclicos, que são as formas infetantes (Bates & Rogers, 2004; Gramiccia & Grandoni, 2007; Tomás & Romão, 2008).

Ambas as formas promastigotas e amastigotas podem iniciar uma infeção. Na derme do hospedeiro, os promastigotas metacíclicos são fagocitados por células dendríticas e macrófagos do SFM (Chance, 1981). Dentro do fagossoma, transformam-se nas formas amastigotas, infetantes para o flebótomo, que crescem e se multiplicam dentro dos vacúolos parasitóforos (Antoine, Prina, Lang & Courret, 1998). As que sobrevivem à fagocitose multiplicam-se e saem, rebentando as células, espalhando a infeção através de novos de macrófagos. No cão, além da infeção dos macrófagos da pele, o parasita infeta também macrófagos no sangue e linfa que disseminam a infeção para órgãos como a medula óssea, baço, fígado, linfonodos e até rins e trato gastrointestinal do animal (Reis *et al.*, 2006; Gramiccia & Gradoni, 2007; Tomás & Romão, 2008).

5. Epidemiologia e Principais Vias de Transmissão

A LCan tem grande importância pela sua alta prevalência e ampla distribuição geográfica (Campino, 2002). Nem todos os cães infetados desenvolvem a doença, existindo uma variada resposta imunitária por parte destes. Uns desenvolveram a doença, e outros permaneceram infetados e assintomáticos durante um período superior a cinco anos (Baneth *et al.*, 2008). Os canídeos domésticos têm um papel preponderante como hospedeiro reservatório, na amplificação dos ciclos de vida das leishmanias à volta da Bacia do Mediterrâneo e restantes regiões do Mundo onde a doença seja endémica (Dereure, Pratlong & Dedet, 1999).

Figura 5 - **Distribuição de LCan na Europa** (Adaptado de Solano-Gallego, 2011)



No cão, as formas cutânea (LCCut) e visceral (LCV) são endêmicas em regiões dos trópicos, subtropicais e na Bacia do Mediterrâneo (Figura 5). Geralmente os cães infetados desenvolvem as duas formas em simultâneo (Sasani, Javanbakht, Samani & Shirani, 2014). Quanto às vias de transmissão desta doença, os flebotomíneos têm um papel primordial, senão exclusivo, na manutenção da infeção, geralmente ocorrendo doença nos locais onde estes estejam presentes (Baneth *et al.*, 2008; Quinnell & Courtenay, 2009). Já foi colocada a hipótese de outros ectoparasitas hematófagos serem também infetantes, como pulgas e ixodídeos mas ainda não existem certezas quanto ao papel destes artrópodes na transmissão. Recentemente voltou a detetar-se *L. infantum* em *Culicoides* spp., questionando-se igualmente o seu papel como potencial vetor de *L. infantum* (Slama *et al.*, 2014). Outras vias de transmissão poderão ser a transplacentária, através de uma gestação resultante de um cruzamento onde ambos os cães estão infetados (Rosypal *et al.*, 2005), ou apenas a progenitora (Masucci *et al.*, 2003), e a via sexual (Silva *et al.*, 2009). A infeção por meio de uma transfusão sanguínea, também já foi descrita (Owens *et al.*, 2001; de Freitas, Melo, da Costa-Val & Michalick, 2006). Em Humanos também está confirmada a transmissão direta das formas amastigotas, pela partilha de seringas, transfusões sanguíneas, via transplacentária, transplante de órgãos e por via sexual (Cruz *et al.*, 2002; Morillas-Marquez *et al.*, 2002; Murray, Berman, Davies & Saravia, 2005; Quinnell & Courtenay, 2009). Todas estas vias de transmissão podem ser particularmente importantes, em áreas em que a leishmaniose tenha sido reportada na ausência de insetos flebotomíneos, como no Norte da América e Norte da Europa (Maroli *et al.*, 2010).

5.1. Epidemiologia de Leishmaniose Canina em Portugal

Os vetores transmissores de leishmaniose em Portugal, são insetos flebotomíneos dos géneros *Phlebotomus perniciosus* e *P. ariasi* (Miró *et al.*, 2007; Campino & Maia, 2010). Alvares (1910) notificou o primeiro caso em Portugal, na cidade de Lisboa. Em 1913, Alvares & Pereira da Silva, também em Lisboa, registaram um cão positivo num total de 83 cães. A infeção foi detetada pelo país, originando inicialmente focos de infeção como: região do Alto-Douro (LCan com seroprevalência em média de 18.7%, área metropolitana de Lisboa (3.8% a 10.9%); e Algarve (9.5%) (Dereure, Pratlong & Dedet, 1999; João, Pereira, Cortes & Santos-Gomes, 2006).

O número de casos de leishmaniose canina no nosso País tem vindo a aumentar, com uma prevalência que pode atingir cerca de 20% ou mais, em localidades de regiões endémicas (Campino & Maia, 2010). Atualmente em Portugal, com base em estudos de seroprevalência já realizados, podem ser consideradas endémicas as regiões de Trás-os-Montes e Alto Douro, a sub-região da Cova da Beira, o distrito de Coimbra, a região de Lisboa e Setúbal, o distrito de Évora, a região do Algarve (Schrey, Pires & Macvean, 1989; Campino *et al.*, 2006; Maia *et al.*, 2010), e os distritos de Portalegre, Beja e Castelo Branco (Cortes *et al.*, 2012).

Coloca-se a possibilidade de a LCan ser igualmente endêmica em outras áreas do Alentejo, além do concelho de Évora, e também em algumas áreas do Ribatejo. Estudos atuais confirmam seroprevalências elevadas na área Metropolitana de Lisboa, de 28.8% em Vila Franca de Xira (Santos, 2014), de 5 a 10% em Palmela (Reisinho, 2010), 1 a 4% no Concelho de Mafra (Armés, 2010), até 20% na zona do Pinhal (da Silva, 2009), entre outras. Em quase todo o território continental detetam-se casos esporádicos da infeção (ONLeish, 2008). São referidas seroprevalências em Portugal entre 5 a 20% (Cortes *et al.*, 2012).

6. Patogenia e Lesões

6.1. Patogenia

Alguns cães atraem mais os flebótomos que outros. A diferença deste tropismo pode resultar de uma possível infeção prévia, assim como do odor corporal característico do animal (Roze, 2013).

A resposta imune de um cão a seguir a uma exposição ao vetor infetado por *L. infantum* é muito variável. A infeção pode variar de assintomática a uma doença multisistémica grave (Saridomichelakis, 2009). Os animais infetados são classificados como suscetíveis ou resistentes. Nos primeiros, a multiplicação parasitária ocorre sem controlo, ao passo que nos cães resistentes existe uma eliminação eficaz das formas amastigotas (Baneth & Solano-Gallego, 2012). No entanto, há cães que se tornam clinicamente normais sem tratamento e cães resistentes que se tornam suscetíveis anos mais tarde, caso o animal se torne imunodeprimido (Travi *et al.*, 2001; Moreno & Alvar, 2002; Baneth *et al.*, 2008).

Em cães infetados natural e experimentalmente, durante a progressão patente da LVC, as funções mediadas pelas células T tornam-se deprimidas e os títulos de anticorpos anti-*Leishmania* aumentam. Nos cães assintomáticos prevalece uma imunidade do tipo celular e os títulos de anticorpos são baixos (Pinelli *et al.*, 1994; Martínez-Moreno *et al.*, 1995).

Após a inoculação das leishmanias na pele do hospedeiro, estas multiplicam-se nos macrófagos da região. A falha de uma resposta imunitária eficaz leva a uma disseminação para zonas como a medula, baço e fígado (Alexandre-Pires & Correia, 2008).

Em áreas endémicas, diversos fatores relativos ao hospedeiro (sexo, idade, genética, estado nutricional, infeções concomitantes) assim como a virulência da estirpe de *Leishmania*, desempenham um certo papel na resposta do cão à infeção. Para certos autores o sexo não é relevante (Ciaramella *et al.*, 1997; Dantas-Torres, de Brito & Brandão-Filho, 2006; Mesquita de Figueiredo *et al.*, 2014), para outros os machos têm maior propensão para a doença (Miranda *et al.*, 2008). Relativamente à idade, as opiniões variam, referindo-se dois picos de prevalência da doença: antes dos 2 e após os 8 anos de idade (Cardoso *et al.*, 2004; Gálvez *et al.*, 2010; Solano-Gallego *et al.*, 2011), outros autores referem que cães com menos de dois anos, têm sete vezes maior hipótese de serem seropositivos (Dantas-Torres *et al.*, 2006; Mesquita de Figueiredo *et al.*, 2014), outros

referem uma maior frequência em cães adultos (Almeida, Mendonça & Sousa, 2010), e outros afirmam nem haver predisposição etária (Santos *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2010). Todas as raças são suscetíveis à infecção, embora algumas, como a Boxer, Labrador Retriever, Cocker Spaniel, Rottweiler, Pastor Alemão, Beagle e Mastim Napolitano sejam mais do que outras. Já no Podengo de Ibiza é raro desenvolverem-se sinais clínicos (Solano-Gallego *et al.*, 2000; França-Silva *et al.*, 2003; Baneth *et al.*, 2008; Miranda *et al.*, 2008; Cortes *et al.*, 2012). Outros verificaram menor susceptibilidade de raças portuguesas em relação às importadas (Pereira da Fonseca *et al.*, 2007, citados por Santos, 2014).

6.2. Lesões

Existem várias lesões encontradas nesta infecção, a nível do aparelho locomotor, pele, mucosas, globo ocular, linfonodos e medula óssea, baço, rins, fígado e tubo digestivo (Alexandre-Pires & Correia, 2008). O diagnóstico clínico da LCan é por vezes difícil devido à variabilidade dos sinais clínicos, isolados ou combinados, e devido ao longo período de incubação (PI), entre 3 meses a 6 anos (Roze, 2013) ou 7 anos (Baneth & Solano-Gallego, 2012). Os sinais mais frequentes são: lesões cutâneas (“óculos”, “cancros de inoculação”, hiperqueratose da trufa e almofadinhas plantares, alopecias), linfadenopatia; fadiga, perda de peso, poliúria e polidipsia, alterações oculares (queratoconjuntivite, uveíte, glaucoma, blefarite, conjuntivite, etc), epistaxis, hipertermia (um em cada três animais), onicogrifose, atrofia muscular, enterite hemorrágica, claudicações por poliartrite, sinovite, osteomielite e por vezes, alterações neurológicas (Petersen & Barr, 2010; Roze, 2013). A falência renal continua a ser a maior causa de morte em cães portadores de *Leishmania* (Solano-Gallego *et al.*, 2011; Baneth & Solano-Gallego, 2012; Roze, 2013;). Na maioria dos casos a LCan é uma doença arrastada, subaguda a crónica, com uma progressão da sintomatologia ao longo de meses (Baneth & Solano-Gallego, 2012; Roze, 2013).

7. Resposta Imune

Em focos endémicos de LCan cerca de 50% a 60% dos cães naturalmente infetados e seropositivos, não evidenciam sintomas (Abranches *et al.*, 1991; Cabral, O’Grady, & Alexander, 1992; Oliveira, Santoro, & Sadigursky, 1993). Apesar de comprovada a ausência de relação entre a capacidade de infecção do vetor, a gravidade da doença e a sintomatologia, tem-se demonstrado a existência de uma correlação positiva entre a resposta sorológica desenvolvida e a aptidão para infetar o vetor (Molina *et al.*, 1994). Quando um cão é picado, ou evita o estabelecimento da infecção e permanece saudável, é infetado e não desenvolve sintomatologia, ou torna-se sintomático após a infecção, tendo uma cura clínica espontânea ou uma evolução para uma infecção crónica (Pereira, 2008). O hospedeiro vertebrado monta uma resposta imunitária inata local e uma adquirida, do tipo celular ou humoral, face à *L. infantum* (Cabral *et al.*, 1998; Reis *et al.*, 2006). Uma resposta

celular (tipo Th1) confere proteção e a imunidade do tipo humoral (tipo Th2) suscetibilidade do cão à infecção acompanhada de uma depressão da imunidade celular (Pinelli *et al.*, 1994; Barbiéri, 2006).

A imunidade inata constitui então a primeira linha de defesa do organismo, sendo os neutrófilos as primeiras células recrutadas para o local com o objetivo de fagocitar e eliminar as formas promastigotas, seguindo-se outra fagocitose mediada por macrófagos (Santos-Gomes, Rodrigues & Marques, 2008; Birnbaum & Craft, 2011).

7.1. Celular

O desenvolvimento deste tipo de resposta imunitária contra a leishmaniose foi demonstrado experimentalmente em cães, na década de 90 por Cabral *et al.* (1992) e Pinelli *et al.* (1994). É largamente aceite que os macrófagos desempenham um papel central no controlo da infecção por *Leishmania* sp.. Citoquinas como o Interferão- γ (IFN- γ), Interleucina-2 (IL-2) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), secretados pelas células Th CD4+ ativadas, induzem uma ação leishmanicida por parte dos macrófagos (Abranches *et al.*, 1998; Gad Baneth *et al.*, 2008). O principal mecanismo envolvido na resposta imunitária protetora que ocorre em cães infetados com *L. infantum*, é a ativação dos macrófagos pelo IFN- γ e TNF- α para eliminar as formas amastigotas intracelulares através da via L-arginina – óxido nítrico (NO) (Birnbaum & Craft, 2011). De facto, estudos recentes mostraram que a produção de IFN- γ por parte dos linfócitos Th1 desempenha um papel essencial no desenvolvimento de uma boa resposta imunitária (Strauss-Ayali, Baneth & Jaffe, 2007; Alves *et al.*, 2009).

Os linfócitos T englobam as subpopulações linfocitárias CD4+ e CD8+, que se subdividem funcionalmente segundo o tipo de citocinas que produzem. Assim, os linfócitos Th CD4+ do tipo Th1 estão associados à produção de IFN- γ e IL-2, entre outros. Os linfócitos do tipo Th2, produzem IL-4 e IL-10, entre outros (Santos-Gomes, Rodrigues & Marques, 2008). Os linfócitos T CD8+ são células citotóxicas com atividade citolítica direta nos macrófagos infetados (Alexandre-Pires *et al.*, 2010). Títulos altos de linfócitos Th CD4+ e T CD8+ circulantes e uma baixa expressão do complexo maior de histocompatibilidade classe II (MHC-II) por parte dos linfócitos presentes no sangue periférico, parecem ser os elementos chave para uma resposta imunológica eficaz, um marco na LCan assintomática (Reis *et al.*, 2006). As citocinas derivadas dos macrófagos, que inibem a morte dos parasitas intracelulares, incluem o TGF- β e IL-10. Esta IL-10 é considerada uma reguladora da atividade dos linfócitos Th1 que mantém o equilíbrio entre as respostas Th1 e Th2 e inibe a atividade microbicida dos macrófagos infetados (Barbiéri, 2006; Day, 2007).

A prevalência de uma resposta Th1 ou Th2, ao nível do tecido cutâneo, depende da capacidade das células de Langerhans e dos queratinócitos processarem e expressarem, à superfície, complexos de moléculas de classe II do MHC e antígenos parasitários, a fim do

desenvolvimento de uma resposta imunitária eficiente (Santos-Gomes, Rodrigues & Marques, 2008).

7.2. Humoral

A LCan está frequentemente associada a uma resposta humoral vinculada, que não confere proteção contra a infecção. Os níveis de imunoglobulinas (Ig) *Leishmania*-específicas detetados nos cães sintomáticos, são maiores do que os níveis detetados em cães assintomáticos, tendo-se encontrado uma forte associação entre estes, o quadro clínico do animal e a carga parasitária presente nos seus tecidos (Reis *et al.*, 2006).

Os linfócitos B são ativados através do contato com o antígeno (Ag), proliferando e diferenciando-se em plasmócitos produtores de anticorpos (Ac). Os anticorpos agrupam-se em 5 classes ou isotipos: IgA, IgD, IgE, IgG, IgM. A IgG apresenta quatro subclasses: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 (Santos-Gomes, Rodrigues & Marques, 2008). A análise das subclasses de IgG em cães parasitados mostrou que Ac do tipo IgG2 estão associados a infecções assintomáticas, e Ac do tipo IgG1 ao desenvolvimento da doença (Deplazes *et al.*, 1995; Day, 2007). Vários autores têm mostrado ultimamente a existência de uma associação entre baixos níveis de IgG e a secreção de citocinas do tipo Th1 e entre níveis altos de IgG e secreção de citocinas tipo Th2 (Reis *et al.*, 2006).

É atualmente claro que uma infecção sintomática está sorologicamente associada a títulos altos de classes de Ig específicas, como IgG, IgE e IgA, o que é consistente com o modo de funcionamento da imunoregulação Th2 já referido (Iniesta, Gállego, & Portús, 2005; Reis *et al.*, 2006). É possível que a resposta do tipo Th2 seja produzida durante o período de incubação da doença e determine a progressão da infecção e o aparecimento dos sinais clínicos (Alvar *et al.*, 2004). Como os linfonodos (Ln) são o primeiro órgão afetado após uma disseminação sistêmica do parasita, é provável que a imunidade que se observa nestes gânglios seja extremamente importante para determinar o prognóstico da infecção (Alves *et al.*, 2009).

A análise de órgãos linfóides de cães naturalmente infetados revelou áreas de linfócitos B, principalmente plasmócitos, associados a grande produção de Ac anti-*Leishmania* (Reis *et al.*, 2006). O que sugere que a migração dos linfócitos B dos tecidos periféricos para os linfóides (Ln eferente) pode ocorrer durante a forma ativa da LCV, com ativação e diferenciação destas células em plasmócitos. Ocorre, assim uma grande produção de Ac anti-*Leishmania* (Reis *et al.*, 2006), com consequente formação de imunocomplexos que se depositam em várias estruturas (glomérulos, vasos e articulações), desenvolvimento de reações inflamatórias granulomatosas e produção de Ac antinucleares (ANA's) (Baneth *et al.*, 2008; Alexandre-Pires & Correia, 2008).

8. Diagnóstico

Apesar do desenvolvimento destas diversas técnicas de diagnóstico parasitológico, serológico e molecular, o diagnóstico de infeção canina por *L. infantum* permanece um desafio. Torna-se por vezes complicado devido à diversidade de apresentações clínicas, sinais inespecíficos e sintomatologia incomum (fases iniciais de infeção) mimetizando outras doenças, bem como pela elevada percentagem de portadores assintomáticos existente (Baneth & Aroch, 2008). Assim, é recomendada a realização de métodos específicos e com elevada sensibilidade para a obtenção do diagnóstico definitivo (Campillo *et al.*, 1999, citado por Marques, 2008). No entanto, não existem testes de diagnóstico que tenham 100% de especificidade e sensibilidade (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

O diagnóstico da infeção por *L. infantum* no cão realiza-se pelos seguintes motivos: para confirmação da doença, analisando se um cão com sinais clínicos e/ou alterações clinicopatológicas compatíveis tem de facto a doença; investigar a presença de infeção em estudos epidemiológicos; monitorizar cães clinicamente saudáveis que vivam ou viajem para regiões endémicas; prevenir a infeção através de transfusões sanguíneas, em portadores assintomáticos; evitar a importação de cães infetados para países não endémicos e monitorizar a resposta ao tratamento (Miró *et al.*, 2008; Solano-Gallego *et al.*, 2011) e como despiste pré-vacinal (ESTEVE, 2011).

O diagnóstico de LCan é acima de tudo clínico e deve basear-se sempre numa abordagem integrada, onde se considera a história pregressa, exame físico, sinais clínicos, resultados de análises laboratoriais e resultados de testes de diagnóstico específicos para a deteção do parasita (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Baneth & Solano-Gallego, 2012).

8.1. Diagnóstico Clínico

8.1.1. Apresentações Clínicas

A LCan é uma doença crónica, com uma forma cutânea e uma forma visceral, onde ambas as formas estão frequentemente presentes. No cão, a pele fica afetada à medida que a infeção se espalha pelos órgãos internos (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Baneth & Solano-Gallego, 2012).

Os sinais clínicos podem classificar-se em: polissintomáticos (mais de dois sintomas), oligossintomáticos (um ou dois sintomas) e assintomáticos (sem qualquer sinal clínico) (Veja *et al.*, 2003, citados por Romero *et al.*, 2008; Solano-Gallego *et al.*, 2009).

8.1.2. Anamnese e Exame Físico

A LCan é uma doença sistémica que pode envolver qualquer órgão, tecido e fluido biológico. Os principais sinais clínicos detetados ao exame físico incluem, lesões cutâneas como “cancros de inoculação”, ulcerações muco-cutâneas (Figura 8), alopecias e descamações; pelagem em mau estado; linfadenomegália localizada/generalizada; caquexia; atrofia

muscular dos mastigadores, temporal, escápulas, anca e/ou coluna vertebral; intolerância ao exercício; apetite diminuído; letargia; esplenomegália; poliúria e polidipsia; lesões oculares; epistáxis (Figura 7); onicogribose; claudicação; vômito e diarreia (Ciaramella *et al.*, 1997; Solano-Gallego *et al.*, 2009; Baneth *et al.*, 2008; Petersen, 2010) (Figura 9). A maioria dos cães sintomáticos (Figura 6) apresenta lesões dermatológicas (50 a 90%) (Shaw *et al.*, 2009; Solano-Gallego *et al.*, 2011). Sinais clínicos variados e inespecíficos tornam a lista de diagnósticos diferenciais de LCan extensa (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

Figura 6 – **Cão com sinais clínicos de Leishmaniose** (Adaptado de Otranto *et al.*, 2013)



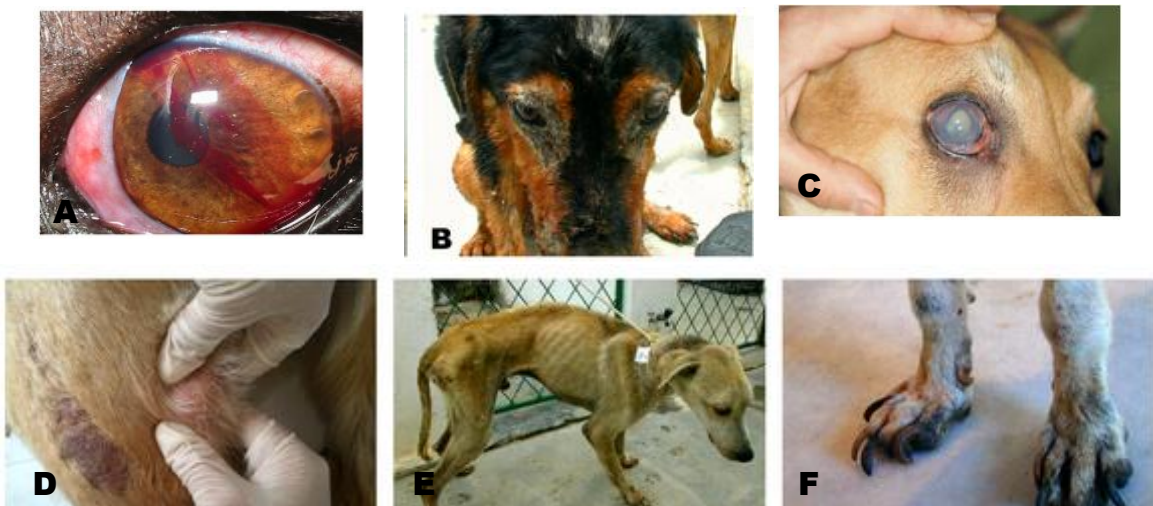
Figura 7 – **Epistáxis unilateral** (Adaptado de Greene, 2013)



Figura 8 – **Ulceração muco-cutânea** (Adaptado de Greene, 2012)



Figura 9 – **Principais sinais clínicos associados a LCV:** (A) Hifema e edema da córnea, (B) Dermatite com queratoconjuntivite e hiperqueratose, (C) Glaucoma em estadio avançado, (D) Linfadenomegália do linfonodo poplíteo, (E) Caquexia, (F) Onicogribose. (Adaptado de Peña, Roura, & Davidson, 2000; Brito *et al.*, 2006; Veras, Fraga, Solcà & Guedes, 2014).



As lesões cutâneas de LCan assemelham-se a demodicose, dermatofitíases, piodermite, dermatite ulcerativa, entre outras. A linfadenopatia pode confundir-se com uma doença linfoproliferativa. Muitas outras afeções, como poliartrite e causas de glomerulonefrite, devem ser consideradas como diagnósticos diferenciais (Roze, 2013).

Na LCan também se observam lesões atípicas como, lesões nas mucosas da cavidade oral e órgãos genitais; articulações com ou sem poliartrite; lesões osteolíticas ou osteoproliferativas; hepatite crônica (Rallis *et al.*, 2005; Adamama-Moraitou *et al.*, 2007); doença autoimune e alterações cardiovasculares (pericardite, vasculite sistêmica, tromboembolismo (Petanides *et al.*, 2008; Solano-Gallego *et al.*, 2009).

8.1.3. Alterações no hemograma, análises bioquímicas e urianálise

Existem diversas alterações laboratoriais a nível do hemograma, análises bioquímicas (bq) e urianálise, tais como: anemia não-regenerativa (em 60 a 73% dos casos), trombocitopenia (29 a 50%), leucocitose ligeira (24% dos casos) ou leucopenia (22%) associada a linfopenia, eosinopenia e monocitopenia. A nível das bq pode encontrar-se azotemia (16 a 45% dos casos), hiperfosfatemia, hipermagnesiemia, Fosfatase Alcalina Sérica (FAS) e Alanina Aminotransferase (ALT) aumentadas (16 a 61% dos casos) e hipercolesterolemia (Reis *et al.*, 2006; Solano-Gallego *et al.*, 2009; Petersen, 2010; Trópia de Abreu *et al.*, 2011; Baneth & Solano-Gallego, 2012; Veras *et al.*, 2014). Verifica-se também hiperproteinemia (63 a 72%), hiperglobulinemia (aumento das β e γ globulinas em 71% dos casos) associada ao aumento da produção de anticorpos, e hipoalbuminemia (em 68 a 94% dos casos). A hipergamaglobulinemia não é patognomônica de LCan, apesar de existir em 80% dos cães doentes (Roura, 2007, citado por Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). Na urianálise é comum encontrar proteinúria (72 a 85% dos casos), por nefropatias com perda de proteína, como glomerulonefrite com deposição de imunocomplexos, sinónimo de doença renal (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Petersen, 2010; Baneth & Solano-Gallego, 2012).

9. Insuficiência Renal Crónica e Leishmaniose canina

A LCan é uma causa comum de glomerulonefrite e insuficiência renal crónica (IRC) na Bacia Mediterrânica (Martínez-Subiela *et al.*, 2013), que constitui a maior causa de morte no cão (Solano-Gallego *et al.*, 2011; Baneth & Solano-Gallego, 2012). Inicialmente, os cães infetados podem ter proteinúria moderada ou grave com ausência de azotemia, seguida mais tardiamente, de lesões tubulares, azotemia e falência renal (Zatelli *et al.*, 2003, citado por Martínez-Subiela *et al.*, 2013). As lesões renais causadas podem ser primariamente atribuídas à deposição intraglomerular de imunocomplexos, que induz a ativação do complemento pela via clássica, fazendo com que estes imunocomplexos sejam solubilizados e fagocitados por macrófagos e neutrófilos. Algumas interleucinas produzidas pelos macrófagos também têm alguma ação quimiotática nos linfócitos, com um consequente aumento da resposta imunitária. Estas lesões renais causam falência renal a longo prazo (Castagnaro *et al.*, 2007).

O diagnóstico precoce de doença renal é benéfico para o animal e pode prolongar a sua vida. Apesar da alta prevalência de patologia renal, a azotemia típica de insuficiência renal

não é um achado comum e só é evidente quando a maioria dos nefrónios estão disfuncionais, numa fase avançada da doença.

Em cães doentes, é então essencial avaliar a função renal e fazer o estadiamento e sub-estadiamento de uma possível insuficiência renal crónica (IRC) através das recomendações da International Renal Interest Society (IRIS) (IRIS, 2013). O estadiamento assenta inicialmente na medição da creatinina sérica [CS](mg/dl) do animal em jejum, fazendo pelo menos duas medições. O subestadiamento baseia-se na proteinúria, através do rácio UPC, e na pressão sanguínea (mmHg) (Tabelas 5 e 6). Existem 4 estadios de IRC de acordo com a IRIS (2013), de acordo com a concentração da creatinina sérica encontrada e de acordo com presença de azotémia e sinais clínicos (Tabela 4).

Tabela 4 – **Estadiamento da Insuficiência Renal Crónica Canina** (Adaptado de IRIS, 2013)

Estadio	Creatinina Plasmática (mg/dL)	Lesão Renal/Sinais Clínicos
I Não azotémico	< 1.4	Incapacidade de concentração urinária; proteinúria persistente de origem renal; alterações renais no exame físico, nos exames imagiológicos e/ou na biópsia. Ausência de sinais clínicos.
II Azotémia Renal Ligeira	1.4 - 2.0	Perda progressiva de tecido renal funcional. Ausência ou presença de sinais clínicos ligeiros, como PU/PD.
III Azotémia Renal Moderada	2.1 - 5.0	Declínio da taxa de filtração glomerular. Sinais clínicos sistémicos podem estar presentes.
IV Azotémia Renal Grave	> 5.0	Perda significativa das funções renais. Presença de sinais clínicos sistémicos relacionados com a síndrome urémica.

Tabela 5 – **Sub-estadiamento de IRC Canina com base no rácio UPC** (Adaptado de IRIS, 2013)

Sub-estadio	Valores do rácio UPC
Não proteinúrico (NP)	< 0.2
Proteinúrico no limite (PL)	0.2 - 0.5
Proteinúrico (P)	> 0.5

Tabela 6 – **Sub-estadiamento de IRC Canina com base na pressão arterial sistémica** (Adaptado de IRIS, 2013)

Sub-estadio	Pressão arterial sistólica (mmHg)	Pressão arterial diastólica (mmHg)
0 Risco Mínimo	< 150	< 95
1 Risco Ligeiro	150 - 159	95 - 99
2 Risco Moderado	160 - 179	100 - 119
3 Risco Elevado	≥ 180	≥ 120

10. Diagnóstico Laboratorial

10.1. Diagnóstico Parasitológico

O método mais simples e bastante usado pelo veterinário clínico é o uso da microscopia ótica para a visualização citológica de formas amastigotas livres ou dentro de macrófagos, monócitos ou neutrófilos, em esfregaços com coloração Giemsa, provenientes de biópsias de medula óssea, baço, linfonodo ou de pele lesionada (Baneth & Solano-Gallego, 2012). Este método de diagnóstico é direto e permite identificar o parasita a nível do seu género, pois todas as leishmanias são caracterizadas pela homogenidade na sua morfologia (Gramiccia, 2011). Num esfregaço, visualiza-se o citoplasma corado de azul, com um núcleo relativamente grande e vermelho, assim como o cinetoplasto com um formato oval e tom violeta/vermelho forte (Maia & Campino, 2008; Gramiccia, 2011).

Considera-se que este método possui 100% de especificidade, dependendo da habilidade do operador e qualidade do esfregaço (Saridomichelakis *et al.*, 2005; Baneth & Solano-Gallego, 2012). A sensibilidade é bem menor que a especificidade, variando entre 30% e 100% para biópsias a linfonodos, e entre os 6.2% e 100% para esfregaços de medula óssea (Saridomichelakis *et al.*, 2005). É uma técnica rápida, de baixo custo e pouco traumática. Podem existir falsos negativos (FN) por falhas do operador, esfregaços de má qualidade, cães com infeção subclínica assintomáticos ou com sinais clínicos ligeiros ou pela existência de baixa carga parasitária (Baneth & Solano-Gallego, 2012; Veras *et al.*, 2014). Por vezes a citologia não revela o protozoário ou observam-se poucos, deixando dúvidas sobre a carga parasitária do animal. Recorre-se então a métodos de imunohistoquímica, que permitem aumentar a sensibilidade do diagnóstico citológico (Alvar *et al.*, 2004).

Outro meio de diagnóstico é através de culturas *in vitro* dos parasitas, que permite identificar formas promastigotas viáveis. O material colhido do animal contém as formas amastigotas que durante a cultura se vão transformar nas formas promastigotas (Alvar *et al.*, 2004; Veras *et al.*, 2014). Esta técnica tem uma especificidade de 100% mas é morosa, com fácil contaminação e muito exigente quanto aos meios de cultura, tendo também uma menor sensibilidade do que as técnicas de PCR e serologia, servindo principalmente para fins de investigação (Miró *et al.*, 2008; Veras *et al.*, 2014).

10.2. Diagnóstico Serológico

O diagnóstico serológico baseia-se na deteção da presença de Ac anti-*Leishmania*, que se ligam especificamente ao agente patogénico, uma fração purificada deste ou a proteínas recombinantes desse agente (Ferrer, 1999). Atualmente existem diversos testes sorológicos que detetam níveis de imunoglobulinas específicas, como IgG, principalmente IgG1, que constituem uma importante ferramenta no diagnóstico de LVC. Rodríguez-Cortés *et al.*, (2007) observaram que os cães experimentalmente infetados produzem primariamente imunoglobulina IgM específica para a *Leishmania* sp. assim como IgG específica, numa

resposta secundária. As IgE só são produzidas por animais com sinais patológicos (Iniesta, Gállego & Portús, 2005) e as IgA, em cães sintomáticos aumentam a produção à medida que o parasita se dissemina (Rodríguez-Cortés *et al.*, 2007).

Os testes de diagnóstico serológico são relativamente simples de realizar e são frequentemente usados na determinação da prevalência de LCan, em estudos epidemiológicos e no seu diagnóstico clínico (Baneth & Solano-Gallego, 2012). Os testes habitualmente mais usados na deteção de Ac anti-*Leishmania* são: IFI, ELISA e testes rápidos baseados em imunocromatografia (Alvar *et al.*, 2004; Maia & Campino, 2008; Miró *et al.*, 2008). Estes testes rápidos de imunodiagnóstico começaram a ser rotineiros em clínica e laboratório (Veras *et al.*, 2014). São rápidos (em cerca de dez minutos fornecem o diagnóstico), de fácil leitura e transporte (de Lima *et al.*, 2010). Um resultado positivo requer uma avaliação posterior através de uma serologia quantitativa (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

10.2.1. Imunofluorescência Indireta (IFI)

A técnica de IFI, que geralmente usa a forma promastigota inteira do parasita cultivada *in vitro* como Ag, é altamente específica e sensível para a deteção de Ac específicos de LCan, sendo considerada o *gold standard* das técnicas serológicas (Alvar *et al.*, 2004; Maia & Campino, 2008; Baneth & Solano-Gallego, 2012). No entanto, numa infeção natural, o hospedeiro vertebrado reage imunologicamente com as formas amastigotas do parasita (Boarino *et al.*, 2008). Num estudo de Fernández-Pérez *et al.*, (1999), verificou-se que a IFI usando as formas amastigotas em vez das promastigotas, tem maior sensibilidade sem perder especificidade, em casos de baixos títulos de Ac específicos, o que permite um diagnóstico precoce na ausência de sinais clínicos.

Embora seja o *gold standard*, esta técnica pode ter alguma falta de sensibilidade quando surgem cães infetados mas que estejam clinicamente saudáveis (Mettler *et al.*, 2005). É muito útil e bastante usada na prática clínica, útil em estudos epidemiológicos, assim como em monitorizações pós tratamento (Gradoni, 2002; Maia & Campino, 2008). No entanto, para Alvar *et al.* (2004), subestima a taxa de infeção das populações em áreas endémicas, gerando alguns resultados falsos negativos. Solano-Gallego *et al.* (2009) recomendam a repetição do teste de IFI 6 meses após o tratamento inicial para monitorização da evolução da doença e do tratamento.

Existem *kits* comerciais disponíveis como: *Leishmania*-Spot IF (Laboratório bioMérieux®, França), IFI-Leishmaniose-Visceral-Canina-Bio-Manguinhos (Fiocruz), entre outros.

É importante saber o título a partir do qual um soro é considerado positivo. O limiar de positividade ou *cut-off* varia consoante os laboratórios, variando habitualmente entre 1:40 e 1:160. Esta falta de um padrão é a maior desvantagem da IFI quando é usada em estudos epidemiológicos, não sendo os dados de diferentes pesquisas facilmente comparáveis

(Ferroglia & Vitale, 2006), por isso dever recorrer-se a Unidades Internacionais. A aplicação desta técnica requer experiência por parte do operador e condições laboratoriais certas. O facto de se ter de realizar diluições seriadas, torna o teste demorado e pouco prático para uma grande amostragem de soros (Melo & Gontijo, 2004; Maia & Campino, 2008).

A sensibilidade da IFI na deteção de cães infetados já foi analisada e reportada por diversos autores. A sensibilidade pode variar entre 68 a 100% e a especificidade entre 60 a 90% (Lira *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2007; Ferroglia, Centaro, Mignone, & Trisciuglio, 2007; Alves *et al.*, 2012). Já para Maia *et al.* (2009), em cães assintomáticos e sintomáticos numa área endémica, a sensibilidade e especificidade foi de 87.5% e de 94.7%, respetivamente.

10.2.2. Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

A técnica de ELISA, sendo uma técnica serológica, permite a deteção de pequenas quantidades de Ag como proteínas, péptidos, hormonas, ou Ac numa amostra líquida. Utiliza anticorpos ou, mais raramente, antígenos marcados com enzimas para detetar moléculas biológicas (Ag ou Ac). Atualmente existem vários tipos de ensaios imunoenzimáticos modificados tais como ELISA Indireto, ELISA Sanduíche e ELISA de competição (Gan & Patel, 2013). A ELISA utilizada no diagnóstico de Leishmaniose, permite igualmente a deteção de anticorpos específicos, utilizado um antígeno solúvel adsorvido a uma superfície de plástico sobre o qual são colocados os soros suspeitos. A evidenciação dos complexos antígeno/anticorpo é efectuada pela adição de um conjugado anti-espécie ligado a uma enzima, do substrato enzimático e de um cromogénio, desencadeando uma reacção enzimática demonstrada pelo aparecimento de cor (Maia & Campino, 2008). Esta técnica pode ser realizada através do soro ou diretamente em sangue. Os principais Ag usados são extratos solúveis de promastigotas e proteínas purificadas recombinantes (Miró *et al.*, 2008). O extrato inteiro do parasita é sensível para a deteção de infeção subclínica ou clínica mas apresenta uma especificidade relativamente baixa (Mettler *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2007). No entanto, com o uso de péptidos recombinantes como as proteínas K9, K26 e K39, a técnica de ELISA é bastante específica (99%) e sensível (96%) na deteção de cães infetados clinicamente saudáveis (Mettler *et al.*, 2005; Porrozzini *et al.*, 2007). Outros autores descreveram especificidades e sensibilidades de, respetivamente: 96 a 100% e 95 a 100% (ambas de 100% quando usado o Ag K26, ou uma sensibilidade de 95% e uma especificidade de 100% quando usado o Ag K9 e K26) (Rosati *et al.*, 2003; Rosário *et al.*, 2005).

Existem vários *kits* comerciais disponíveis, como por exemplo: LEISCAN[®] LEISHMANIA ELISA TEST (Esteve Veterinária, Espanha), ID Screen[®] (IDVet, França) e *Leishmania* 96[®] (Agrolabo S.p.A., Itália).

O método ELISA tem demonstrado uma maior sensibilidade e especificidade em comparação com o método de IFI, usando o extrato inteiro ou solúvel de *Leishmania* na

forma amastigota, ou usando o extrato solúvel de *Leishmania* na forma promastigota, dependendo da opinião de certos autores (Moreira *et al.*, 2007; Rodríguez-Cortés, Ojeda, Todolí & Alberola, 2013; Solano-Gallego *et al.*, 2014).

10.2.3. Outros – Contra-Imunoelectroforese (CIE), Teste de Aglutinação Direta (TAD), Western Blot (WB)

É importante referir a existência de outras técnicas de diagnóstico menos habituais, como a técnica de Contra-Imunoelectroforese (CIE), o Teste de Aglutinação Direta (TAD) e o Western Blot (WB). A técnica de CIE é usada na deteção de anticorpos anti-*Leishmania* e foi desenvolvida por Barbosa *et al.* (1973). Baseia-se na visualização de um precipitado em forma de arco em gel de acetato de celulose, devido à interação entre os antígenos de *Leishmania* e anticorpos presentes na amostra de soro submetida a eletroforese (Maia & Campino, 2008). A CIE também pode ser usada para analisar simultaneamente, soros de diferentes hospedeiros. Tem como vantagens: obtenção de resultados em poucas horas; custo relativamente baixo; e o uso de um equipamento simples, tornando a CIE uma opção para estudos epidemiológicos (Mansueto *et al.*, 1982; Abranches *et al.*, 1991, citados por Maia & Campino, 2008). Maia *et al.* (2009) reportaram uma sensibilidade e especificidade de 85.4% e 94.7%, respetivamente, numa área endémica.

O teste de aglutinação direta (TAD) foi descrito pela primeira vez em 1975 e mais tarde adaptado para o diagnóstico da infeção humana e canina, na década de 80 (Veras *et al.*, 2014). É um método que usa o promastigota inteiro e corado, como antígeno, em suspensão (Maia & Campino, 2008). Pode ser usado soro, plasma ou urina como amostra. Já existem testes rápidos nos quais ocorre a incubação do soro com o antígeno figurado, sendo feita a leitura visual após alguns minutos (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). A vantagem desta técnica é o seu baixo custo, pode ser utilizada no laboratório ou campo (Meredith *et al.*, 1995; Schallig *et al.*, 2002). A sensibilidade e especificidade variam entre 70 e 100% (da Silva *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2007). No entanto, para uma grande amostragem não é desejável pois o processo de produção do antígeno de *Leishmania* em bruto é moroso assim como a necessidade de fazer diluições seriadas no soro. Tem um longo tempo de incubação (18 horas) (Maia & Campino, 2008).

O ensaio de Western Blot (WB) provou ser altamente sensível e específico, no entanto não é aplicável ao diagnóstico de rotina (Lasri *et al.*, 2003), é complexo e tem custos elevados, limitando-se atualmente à investigação (Ferroglia *et al.*, 2007). Permite detetar os anticorpos anti-*Leishmania*, bem como determinar a sua especificidade face a diferentes proteínas antigénicas do protozoário. Recentemente, Daneshvar, Mahmmodi, Kamichi, Phillips e Burchmore (2014) e através de WB, distinguiram cães vacinados com uma estirpe de *L. infantum* atenuada, de cães naturalmente infetados com a estirpe selvagem de *L. infantum*. Também pode ser empregue na distinção entre cães infetados assintomáticos e

sintomáticos, na previsão do prognóstico da infecção e identificar novos antígenos envolvidos nas diferentes fases clínicas da doença (Ferroglio & Vitale, 2006).

10.3. Diagnóstico Molecular

Nas últimas décadas a reação em cadeia da Polimerase (PCR) começou a ser usada no diagnóstico de LCan. O seu uso tem demonstrado resultados superiores aos obtidos pela técnica de ELISA, IFI e cultura na detecção de animais infetados por *Leishmania* sp., exibindo uma sensibilidade e especificidade altas (de Paiva Cavalcanti *et al.*, 2009).

A técnica de PCR permite amplificar quantidades muito pequenas do DNA do parasita, é relativamente rápida e pode ser aplicada a qualquer tipo de amostra biológica (medula óssea, linfonodo, biópsias diversas, amostras conjuntivais, sangue) (Ferreira, Ituassu, de Melo & de Andrade, 2008; Manna *et al.*, 2008).

O método de PCR demonstra ser capaz de ultrapassar problemas como a baixa sensibilidade encontrada nos métodos parasitológicos e outros como o valor preditivo limitado da serologia, por interferência de Ac persistentes ou pela presença de imunossupressão. No entanto, os protocolos do PCR dito convencional (cPCR), não permitem uma análise quantitativa da carga parasitária (Manna *et al.*, 2008).

A técnica de PCR é muito útil em casos duvidosos e para a detecção da persistência da infecção em cães tratados que atingiram a cura clínica, no entanto, em cães portadores ou com baixa carga parasitária pós-tratamento, as técnicas qualitativas ou semiquantitativas têm pouco valor diagnóstico, porque apenas indicam se os animais são ou não positivos (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). A informação fornecida pelo PCR deve ser avaliada juntamente com a informação clínica do animal e testes serológicos se necessário (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

10.3.1. qPCR

Uma variante da cPCR, chamada PCR quantitativo em tempo real (qPCR), tornou-se popular no ano 2000. Este método permite detetar, quantificar e/ou diferenciar *Leishmania* spp., num menor tempo e com um reduzido risco de contaminação que o torna mais sensível do que o cPCR (Van der Meide *et al.*, 2005; Francino *et al.*, 2006; Gomes *et al.*, 2008; Maia & Campino, 2008). A qPCR permite uma monitorização em tempo real da amplificação de sequências de DNA específicas, à medida que a reação prossegue, usando fluoróforos que se ligam à cadeia dupla de DNA sintetizada (de Paiva Cavalcanti *et al.*, 2009; Veras *et al.*, 2014).

A tecnologia TaqMan é mais específica na medida em que acede diretamente ao DNA amplificado, através do uso de uma sonda fluorescente específica para a sequência alvo ladeada por um par de *primers* (Maia & Campino, 2008). Enquanto a sonda se encontra

intacta, a molécula *quencher* absorve toda a fluorescência produzida pela molécula *reporter*, mas no momento em que esta hibrida com a região alvo e se dá início à polimerização pela DNA Polimerase a sua atividade exonucleotídica no sentido 5' – 3' leva à hidrólise da sonda, libertando a molécula *reporter* da ação da molécula *quencher* com subsequente libertação de fluorescência que é lida pelo equipamento. Assim, com o acumular do material amplificado verifica-se um aumento da fluorescência emitida (Mortarino *et al.*, 2004). A amplificação é seguida visualmente em gráficos (fluorescência *versus* números de ciclos) permitindo monitorizar, em tempo real, a cinética da reação de amplificação (Vitale *et al.*, 2004).

A qPCR, pelas suas características, torna-se um método eficaz para confirmar o diagnóstico de LCan, especialmente nos casos em que a serologia é inconclusiva, nos casos em que o cão ainda não sofreu uma seroconversão, na monitorização do tratamento (Vitale *et al.*, 2004; Moreira *et al.*, 2007; Martínez *et al.*, 2011). Como desvantagens encontram-se: um custo relativamente elevado, pois necessita de laboratórios especializados, e o facto de um resultado positivo não implicar necessariamente a existência de uma infeção ativa, pois há deteção do DNA parasitário independentemente de estar viável ou não (Maia & Campino, 2008).

10.3.2. Tipos de PCR modificados

A técnica de PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) confirma a presença do parasita, identifica e distingue as espécies de *Leishmania* sp., diferenciando as espécies do novo mundo, *L. (Leishmania) amazonensis*, *L. (Viannia) braziliensis* e *L. (L.) infantum chagasi* (de Andrade *et al.*, 2006) pela hidrólise enzimática do fragmento amplificado. O padrão obtido é característico de cada espécie, permitindo a sua diferenciação. Vários estudos têm relatado a eficiência do método PCR-RFLP na identificação e classificação de espécies de *Leishmania* directamente a partir amostras. Torna-se uma metodologia menos trabalhosa do que a análise isoenzimática pois evita a necessidade de isolamento do parasita (Abda *et al.*, 2011; Srivastava *et al.*, 2011).

O Nested-PCR é outra técnica alternativa ao cPCR, mais sensível mas com um maior risco de contaminação devido aos dois ciclos de amplificação, a que a amostra é submetida (Paltrinieri *et al.*, 2005).

10.4. Outras Técnicas de Diagnóstico

10.4.1. Teste de Montenegro

O Teste de Montenegro avalia a resposta imunitária celular específica por antígenos de *Leishmania*, baseando-se numa reação de hipersensibilidade retardada face aos seus antígenos (Maia & Campino, 2008; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). Consiste na medição do diâmetro da induração habitualmente com mais de 5 mm de diâmetro

acompanhado de eritema, 48 a 72 horas após a inoculação intradérmica do antígeno de leishmanias (leishmanina), contido numa suspensão na qual existem promastigotas inativados diluídos numa solução salina de ou em fenol (Montenegro, 1926, citado por Maia & Campino, 2008; ; Fernández-Bellón *et al.*, 2005; Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). Geralmente o teste é negativo quando existe doença ativa ou ausência de contacto com o parasita, ou no caso de imunossupressão. Numa infeção subclínica em fase inicial, ou após um tratamento eficaz, o teste é positivo.

A Reação de Montenegro é simples de executar e barata, o que a torna apropriada para o trabalho de campo, testando um grande número de animais em simultâneo (Cardoso *et al.*, 2007). No entanto a necessidade de um seguimento após 48 a 72 horas e a possibilidade de resultados falsos positivos (FP) após repetição do teste, diminui a sua utilidade (Fernández-Bellón *et al.*, 2005).

10.4.2. Xenodiagnóstico

Esta técnica é usada na deteção e isolamento de um agente patogénico, recorrendo ao seu vetor artrópode natural (Maia & Campino, 2008). Consiste em expor um cão suspeito de leishmaniose, previamente sedado e colocado numa jaula, à picada de fêmeas de *Phlebotomus* spp. durante cerca de uma hora. Uma semana mais tarde, após a refeição sanguínea, é realizada a dissecação dos insetos para a visualização microscópica das formas promastigotas no seu intestino e avaliação da carga parasitária (Gradoni & Gramiccia, 2008).

Este método é altamente específico e sensível, no entanto não é aplicável na prática clínica na medida em que necessita de laboratórios especializados e colónias de flebotomos bem estabelecidas e disponíveis. Poderá ser útil a nível epidemiológico, na avaliação do estado clínico do animal e monitorização do tratamento (Gradoni & Gramiccia, 2008; Maia & Campino, 2008).

11. Tratamento

O tratamento tem por objetivo a redução da carga parasitária, a resolução de alterações orgânicas causadas pelo parasita, a restauração de uma resposta imunitária eficaz, a estabilização de uma melhoria clínica atingida e a prevenção de recidivas. De facto, todos os fármacos usualmente aplicados a cães, foram descobertos e desenvolvidos para o tratamento da LHum (Oliva *et al.*, 2010). O grande avanço na terapêutica foi a combinação de dois fármacos (politerapia), os antomoniais e alopurinol como 1ª abordagem. Uma cura clínica é frequentemente obtida e um tratamento descontinuado resulta, na maioria dos pacientes, em recidivas passados meses (Oliva *et al.*, 2010; Solano-Gallego *et al.*, 2011).

11.1. Terapêutica Farmacológica

Os fármacos mais usados para o tratamento da LCan são o antimoniato de meglumina, a miltefosina e o alopurinol. Após instituída a terapêutica, segue-se habitualmente uma melhoria do estado clínico do animal, um decréscimo no título de anticorpos anti-*Leishmania* e o ganho da capacidade de montar uma resposta imunitária específica contra o parasita (Baneth, 2002). O tratamento, no entanto não está associado a uma cura parasitológica, não previne uma recidiva, nem impede o vetor de se tornar infetante ao realizar a sua refeição.

Se a condição clínica do animal assim o requerir deve também juntar-se uma terapêutica sintomática. O veterinário clínico deve sempre realizar um exame antes, durante, e no fim de se completar o tratamento (Oliva *et al.*, 2010).

11.1.1. Monoterapia

Os compostos antimoniais foram introduzidos pela primeira vez como fármacos anti-*Leishmania* pelo Dr. Gaspar Vianna, na América do Sul no ano de 1912 (Bahr, 1996, citado por Baneth, 2002). Inicialmente foram utilizados na sua forma trivalente, mas rapidamente, devido à sua toxicidade deram lugar aos pentavalentes como o Antimoniato de N-metil glucamina ou Antimoniato de meglumina (A. Meglumina) e o Estibogluconato de sódio (Baneth & Shaw, 2002; Meireles, 2008), não sendo este último usado em Portugal. Os derivados antimoniais continuam a ser os fármacos de eleição para a LHum e LCan, após 100 anos de utilização (Miró *et al.*, 2008; Roze, 2013). As suas limitações incluem: resistência parasitária, toxicidade para o hospedeiro, custo elevado e a ausência de cura completa em diversos cães (Baneth, 2002). O protocolo mais comum para o tratamento com A. meglumina em infeções naturais é de 100 mg/Kg SID SC, durante 3 a 4 semanas (Slappendel & Teske, 1997; Baneth & Shaw, 2002). No entanto, com doses de 50 ou 75 mg/Kg BID, SC, atingiam-se maiores concentrações plasmáticas (Valladares *et al.*, 1998; Oliva *et al.*, 2010). Efeitos secundários da administração de antimoniais incluem nefrotoxicidade, perturbações gastrointestinais, hepatite, alterações hematológicas, problemas articulares e dor no local da injeção (Baneth, 2002; Roze, 2013).

A Miltefosina é um fosfolípido que se acumula dentro dos macrófagos e atua por interferência no metabolismo dos lípidos, na membrana dos parasitas (Baneth, 2002; Roze, 2013). A miltefosina é administrada pela via oral, habitualmente na dose de 2 mg/kg/dia. Apresenta a vantagem de não sofrer eliminação renal, o que a torna indicada para cães com insuficiência renal (Meireles, 2008; Roze, 2013).

O Alopurinol, análogo estrutural da hipoxantina, pertencente ao grupo das purinas, quando incorporado pelas formas amastigotas intracelulares, é transformado num composto tóxico (4-amino-pirazol-pirimidina), que as elimina (Oliva *et al.*, 2010). A sua dose é: 5-40 mg/kg/dia (10-20 mg/kg BID é o mais usual), durante um período indefinido de tempo, habitualmente entre um a quatro meses ou até, entre 6 a 12 meses. A baixa toxicidade e a sua forma de

administração tornam-no numa mais-valia perante os antimoniais. O principal efeito secundário reportado é a formação de cálculos urinários de xantina (Meireles, 2008; Solano-Gallego *et al.*, 2009; Roze, 2013).

A Domperidona, antagonista da dopamina que induz a libertação de prolactina a partir da hipófise, é usada na dose 0.5 a 1 mg/kg, SC, SID, durante 30 dias. Estimula a imunidade celular e ajuda a controlar a progressão da infeção em estadios iniciais. Em cães saudáveis, previne a infeção (Oliva *et al.*, 2010; Sabate *et al.*, 2013).

Existem outros fármacos que têm sido analisados para o tratamento da leishmaniose. São consideradas terapêuticas de terceira linha.

A Aminosidina, ou sulfato de paromomicina, produzida pelo fungo *Streptomyces rimosus*, é um antibiótico aminoglicosídeo. A administração faz-se por via SC/IM, na dose de 5-10 mg/kg BID, 14 dias a 1 mês (Baneth & Shaw, 2002; Meireles, 2008; Roze, 2005, 2013).

As fluoroquinolonas, como a Marbofloxacin e Enrofloxacin são também propostas para tratar a infeção por *Leishmania*. A enrofloxacin parece ter menor ação e se usada em monoterapia conduz a uma melhoria clínica temporária. A marbofloxacin pode representar um fármaco alternativo, na dose de 2 a 5 mg/Kg/dia, 28 dias. O papel destes compostos para o tratamento de leishmaniose, ainda terá de ser melhor analisado (Vouldoukis *et al.*, 2006; Oliva *et al.*, 2008).

O Metronidazol é usado na dose de 10 a 15 mg/kg, BID, PO, 15 dias. O Ketoconazol é usado na dose de 7 a 25 mg/kg, SID, PO, 3 meses, mas devido à sua nefrotoxicidade deve ser evitado em cães com azotémia. O Itraconazol é recomendado na dose de 4 mg/kg por dia, SID, PO, 6 semanas (Meireles, 2008). Estes três fármacos têm uma eficácia muito reduzida no tratamento de Leishmaniose.

A Anfotericina B é um antibiótico polieno do grupo dos macrólidos, produzido por actinobactérias/actinomicetos, de nome *Streptomyces nodosus* (Baneth, 2002). Tem uma boa atividade anti-*Leishmania* e contra outros protozoários. Atua ligando-se aos episteróis das leishmanias e altera a permeabilidade membranar (Meireles, 2008; Oliva *et al.*, 2010). Apresenta grande toxicidade e efeitos secundários, como nefrotoxicidade (o principal e mais comum), hipertermia, vômito e anorexia (Baneth, 2002; Oliva *et al.*, 2010). A dose recomendada varia de autor para autor, entre 0,1 a 1 mg/kg, diluído em soro fisiológico, IV lenta (Cortadellas, 2003) em dias alternados, durante 1 a 2 meses (Meireles, 2008; Oliva *et al.*, 2010). Existe uma formulação lipossomal deste fármaco administrada até 3 mg/kg, bastante menos tóxica e que confere ao cão uma cura clínica rápida, no entanto existem sempre recidivas (Oliva *et al.*, 1995, citados por Oliva *et al.*, 2010; Baneth & Shaw, 2002).

As Diamidinas são frequentemente utilizadas nas tripanosomoses mas são uma 2ª opção terapêutica para o tratamento de LCan, nos casos de insucesso com antimoniais (Meireles, 2008). Está descrito que este fármaco induz uma boa resposta imunitária, no cão (Rhalem, Sahibi, Lasri & Jaffe, 1999; Roze, 2013). Administra-se na seguinte dose: 2- 4 mg/kg, por via

IM, em dias alternados num total de 15 administrações (Roze, 2013) ou 2-3 vezes por semana num período de 4 a 7 semanas (Meireles, 2008). Este composto apresenta toxicidade local, renal, pancreática e cardíaca, podendo induzir irritação muscular, hipotensão, taquicardia, vômito e choque anafilático (Baneth, 2002; Roze, 2013).

11.1.2. Politerapia

Efetuem-se várias associações medicamentosas tais como: A. Meglumina + Alopurinol ou Aminosidina; Miltefosina + Alopurinol; Metronidazol + Espiramicina ou Enrofloxacina. A combinação de A. Meglumina e Alopurinol aumenta o tempo de remissão da doença, levando a recidivas mais tardias (Roze, 2013), e é o tratamento de 1ª linha. O protocolo que reúne maior consenso consiste numa injeção SC diária de A. Meglumina na dose de 75-100mg/Kg durante um a dois meses, juntamente com Alopurinol, PO, na dose de 10 mg/Kg, BID, durante seis a doze meses (Manna *et al.*, 2008; Solano-Gallego *et al.*, 2009). A combinação de Miltefosina com Alopurinol consiste em administrar Alopurinol por via oral na dose de 20 mg/kg/dia juntamente com Miltefosina, PO, na dose de 2 mg/kg, SID, durante 4 semanas (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Roze, 2013). Esta é uma boa alternativa ao uso dos fármacos antimoniais, tendo menos efeitos secundários, é o tratamento de 2ª linha (Manzillo *et al.*, 2009; Oliva *et al.*, 2010; Roze, 2013).

A combinação Metronidazol + Espiramicina, tem resultados semelhantes aos da combinação de A. Meglumina + Alopurinol, administrado na dose de 25 mg/kg, PO, SID (Roze, 2013), sendo este um tratamento de 3ª linha.

11.2. Terapêutica Sintomática

De acordo com o quadro clínico de cada animal, poderá realizar-se antibioterapia de largo espectro, transfusões sanguíneas, fluidoterapia, terapêutica anti-inflamatória, dietas baixas em proteína, tratamentos dermatológicos, quelantes de fósforo para doença renal, entre outros (Meireles, 2008). É de destacar a realização de um bom maneio da insuficiência renal já que é das principais afeções que se manifestam nesta infeção.

12. Estadiamento Clínico de Leishmaniose Canina – I a IV

A terapêutica instituída deve ter em consideração as diferentes formas clínicas da doença (Oliva *et al.*, 2010). Para tal, um sistema de 4 estadios clínicos baseado nos sinais clínicos, sorologia e alterações clinicopatológicas foi proposto pelo grupo LeishVet, na tentativa de englobar a ampla gama de manifestações clínicas e gravidade da LCan. Para cada estadio existe um protocolo de tratamento e prognóstico diferente (Solano-Gallego *et al.*, 2011) (Tabela 7).

Tabela 7 – Estadiamento clínico de LCan com base na sorologia, sinais clínicos, dados laboratoriais, esquema terapêutico e prognóstico
(adaptado de Solano-Gallego *et al.*, 2011).

Estádios Clínicos	Serologia	Sinais clínicos	Dados Laboratoriais	Terapia	Prognóstico
Estadio I Doença ligeira	Níveis de anticorpos negativos a positivos baixos	Cães com sinais clínicos moderados, como linfadenomegália periférica ou dermatite papular	Sem alterações clinicopatológicas. Perfil renal normal: Creatinina < 1,4 mg/dl; não proteinúrico: rácio proteína creatinina urinária (UP/C) < 0,5	Alopurinol ou antimoniato de meglumina ou miltefosina/alopurinol + antimoniato de meglumina ou alopurinol + miltefosina	Favorável
Estadio II Doença moderada	Níveis de anticorpos positivos baixos a altos	Cães com os sinais anteriores mais lesões cutâneas simétricas/difusas, como dermatite exfoliativa, onicogribose, ulceração, anorexia, perda de peso, febre e epistaxis	Alterações clinicopatológicas como anemia não regenerativa moderada, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia, síndrome de hiperviscosidade sérica Subestádios: a) Perfil renal normal; creatinina < 1,4 mg/dl; UP/C < 0,5 b) creatinina < 1,4 mg/dl UP/C = 0,5-1	Alopurinol + antimoniato de meglumina ou alopurinol + miltefosina	Bom a reservado
Estadio III Doença grave	Níveis de anticorpos positivos médios a altos	Cães com os sinais anteriores mais lesões derivadas a imunocomplexos, como vasculite, artrite, uveíte e glomerulonefrite	Alterações clinicopatológicas do estadio II Insuficiência renal crónica (IRC) IRIS estadio I com UP/C > 1 ou estadio II (creatinina 1,4-2 mg/dl)	Alopurinol + antimoniato de meglumina ou alopurinol + miltefosina Guias IRIS para IRC.	Reservado a desfavorável
Estadio IV Doença muito grave	Níveis de anticorpos positivos médios a altos	Cães com os sinais anteriores mais tromboembolismo pulmonar, síndrome nefrótico e doença renal em estado final	Alterações clinicopatológicas do estadio II IRC IRIS estadio III (creatinina 2-5 mg/dl) e estadio IV (creatinina > 5 mg/dl) Síndrome nefrótico: Proteinúria marcada, UP/C>5	Alopurinol Guias IRIS para IRC.	Desfavorável

13. Prognóstico

Apesar de todos os esforços realizados a nível da sobrevivência do animal infetado, aqueles cuja doença se encontre num estadio avançado, têm pior prognóstico dos que animais assintomáticos ou seropositivos em remissão, e com poucos sinais clínicos. Poderá dar-se uma cura clínica, após um tratamento ou o animal entrar em falência orgânica e morrer.

14. Medidas de Controlo

Atualmente existem diversas medidas de controlo face aos vetores de leishmaniose, tais como: o uso de coleiras impregnadas em inseticidas (Deltametrina), a cada 6 meses e soluções para unção punctiforme (Permetrina e Imidacloprid), a cada 3 semanas (Miró *et al.*,

2007; Bayer, 2011). Existem ainda outras coleiras com combinações de Imidacloprid 10% e Flumetrina 4.5% extremamente eficazes (Otranto *et al.*, 2013) e outras soluções para unção punctiforme apenas com Permetrina a 65%, a cada 2 semanas (Molina *et al.*, 2012) e *sprays*, essencialmente repelentes (Piriproxifeno e Permetrina), que protegem também eficazmente as extremidades (Molina *et al.*, 2006).

Já existem vacinas disponíveis, tanto na Europa (CaniLeish[®]) como no Brasil (Leishvacin[®], LiESAp[®], Leish-Tec[®] e Leishmune[®]) (Palatnik-de-Sousa, 2012; Roze, 2013). A CaniLeish[®], aprovada em março de 2011 pela “EMA – Agência Europeia do Medicamento” para a Europa, já bastante usada em Portugal estimula a imunidade celular responsável pela proteção contra a leishmaniose (Roze, 2013). Em condições extremas e em áreas endêmicas, a vacina reduziu quatro vezes o risco dos animais desenvolverem a doença clínica (Roze, 2013). É recomendado que antes da vacinação se efetue um teste serológico, para se confirmar que se vai vacinar um animal saudável não portador (Virbac, 2011). A combinação da vacina com um produto inseticida tópico confere uma ótima proteção ao animal (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

O fármaco Domperidona desempenha também um papel importante na prevenção da infecção por *L. infantum* promovendo um aumento da resposta imunitária do tipo celular, quando administrada pela via oral, 0,5 mg/Kg, SID, durante 4 semanas.

A prevenção de leishmaniose deve passar também pela utilização de métodos químicos e pelo manejo. Nos períodos de maior atividade dos vetores é desaconselhada a permanência dos cães no exterior, de modo a diminuir a probabilidade da picada (Ciaramella & Corona, 2003). Opta-se também pela pulverização de certos locais no meio ambiente e habitações com inseticidas visando reduzir as taxas de picadas de flebótomos no interior e ao redor das habitações (Quinnell & Courtenay, 2009). A OMS (2014) recomenda um diagnóstico precoce e um manejo eficaz da doença; um controlo dos vetores através de armadilhas, inseticidas com piretróides, etc; manter um sistema de vigilância ativo da doença; controlo dos hospedeiros reservatório; e realização de parcerias com várias entidades de modo a mobilizar e educar a população no sentido de se criarem estratégias de intervenção.

15. Impacto das Leishmanioses na Saúde Pública

Apesar de não ser evidente a relação direta entre a prevalência de LCan e LHum, a presença de cães infetados desempenha um papel importante na manutenção de casos endêmicos de LVZ (Campino & Maia, 2010). No entanto as Leishmanioses são doenças de pobreza, pelo que más condições de higiene, alimentação deficitária, um sistema imunitário fraco e um mau alojamento, são fatores desencadeantes quer em animais, quer em humanos. A Leishmaniose está também relacionada com alterações ambientais como desflorestações, construção de barragens, sistemas de irrigação e com a urbanização de certos locais (OMS, 2014).

16. Babesiose canina

16.1. Etiologia, Epidemiologia, Patogenia e Ciclo de Vida

A babesiose ou piroplasmose, causada por parasitas protozoários do género *Babesia*, é uma doença de grande importância a nível mundial que atinge o cão doméstico (Yabsley *et al.*, 2008). As espécies de *Babesia* são protozoários intracelulares pertencentes ao filo Apicomplexa, frequentemente transmitido por ixodídeos. Já foram descritas mais de 100 espécies. Baseado na sua morfologia, são divididas em duas categorias, grandes e pequenas. As *Babesia* spp. grandes podem ter de comprimento, entre 3 a 7 µm, e as pequenas entre 1 a 3 µm (Irwin, 2009; Birkenheuer, 2013). As duas espécies predominantes no cão são a *B. gibsoni*, (grande), encontrada em África, Ásia, Austrália, Europa e no Norte e Sul da América, e a *B. canis*, (pequena), esta dividida em três subespécies, *B. c. canis*, considerada a principal causa de Babesiose na Europa, é a forma menos agressiva; *B. c. vogeli*, maioritariamente no Sul da Europa e regiões tropicais e semitropicais, de média patogenicidade; e *B. c. rossi* maioritariamente na África do Sul, responsável pela forma mais grave da doença (Yabsley *et al.*, 2008; Irwin, 2009). Um canídeo pode estar infetado, simultaneamente, por mais do que uma subespécie de *Babesia* (Oyamada *et al.*, 2005).

Os principais vetores da babesiose canina são os ixodídeos *Rhipicephalus sanguineus*, *Dermacentor reticulatus*, e *Haemaphysalis elliptica*, tendo cada subespécie de *B. canis* patogenia e vetores próprios. Relativamente à patogenia, a variável crítica é a espécie de piroplasma, mas fatores como a idade, o estado imunitário do animal e infeções concomitantes também desempenham um papel importante (Irwin, 2009).

As espécies de *Babesia* podem ser transmitidas através da picada de um vetor ixodídeo, o modo mais comum, diretamente entre hospedeiros vertebrados (Birkenheuer, 2013) por via transplacentária ou mesmo horizontalmente, através de mordeduras nas lutas de cães, ou ainda por contacto com sangue contaminado, através de agulhas ou transfusões. Durante a hematofagia, os ixodídeos infetados libertam na circulação sanguínea do hospedeiro, juntamente com a sua saliva, esporozoítos infetantes. Estes penetram nos eritrócitos, multiplicam-se por divisão binária, provocando a rutura dos eritrócitos infetados, o que permite a libertação de novos merozoítos prontos a invadir mais eritrócitos (Seixas, Alho, Guerra, & Madeira de Carvalho, 2011). Estes são ingeridos por uma carraça não infetada e através de gametogonia, reprodução sexuada, no intestino do vetor formam um zigoto. Nas células epiteliais do intestino, ocorre esporogonia, reprodução assexuada, e as formas resultantes migram e invadem as glândulas salivares ou ovários, onde farão respetivamente, uma transmissão transtestual ou transovárica (Birkenheuer, 2013).

16.2. Sinais Clínicos, Diagnóstico e Tratamento

Em cães, a infeção por estes hemoparasitas resulta numa variedade de apresentações clínicas, desde doença subclínica a grave, quer pela mesma espécie de *Babesia* ou entre

elas. Caracteriza-se habitualmente por febre, palidez das mucosas, icterícia, trombocitopenia, hipóxia, anemia hemolítica imuno-mediada com fraqueza e colapso associados, esplenomegalia, linfadenopatia, vômito ou doença ligeira com sinais clínicos inaparentes, mais grave em cães jovens (hipotermia, choque, sépsis). Quando existe rutura dos eritrócitos, aumento da osmolaridade nas células infetadas, lesão oxidativa e imuno-mediada, ocorre hemólise intra e extravascular (Irwin, 2009). Também se observa ausência de febre no início, sinais de letargia e anorexia. (Irwin, 2009; Birkenheuer, 2013).

O diagnóstico laboratorial por microscopia usando um esfregaço sanguíneo, continua a ser o mais acessível e simples para a maioria dos veterinários, e para infeções agudas é sensível na deteção dos parasitas intraeritrocitários em esfregaços com coloração Giemsa. A distinção entre grandes e pequenas *Babesia* spp. também é relativamente simples (Birkenheuer, 2013). No entanto, pode ser difícil ou impossível em casos atípicos e casos crónicos, devido à parasitemia intermitente. Os testes serológicos podem ser usados na deteção destes casos (Uilenberg, Franssen, Perié & Spanjer, 1989). Enquanto, que o limite da microscopia é cerca de 0,001% de babesias, o qPCR é capaz de detetar cargas parasitárias de cerca de 50 babesias/mL ou 9 parasitas/ μ L. Embora altamente sensível, não deteta DNA na ausência do organismo na amostra, gerando resultados FN na babesiose crónica (Irwin, 2009). A IFI tem sido, nos últimos 30 anos, o teste principal para detetar babesiose canina. No entanto, a baixa especificidade devido a reações cruzadas com outros hemoparasitas, a subjetividade do operador e ser impróprio para grandes amostragens, torna-a limitante (Aboge *et al.*, 2007). A técnica de ELISA poderá ser também uma opção, sendo que ideal é associar o PCR a uma técnica serológica (Goo *et al.*, 2008).

Os cães infetados apresentam melhoria clínica entre as 24 e 72 horas após o tratamento com fármacos antiprotozoários, embora alguns possam demorar 7 dias a produzir uma resposta. Os fármacos mais usados para as infeções por *B. canis* são os seguintes: Dipropionato de Imidocarb (5 - 6,6 mg/kg, IM, 2^o dose 14 depois ou 7,5 mg/Kg, SC, em dose única); Doxiciclina (5 mg/kg, PO, 90 dias), Aceturato de diminazeno (3,5 mg/kg, IM, em dose única); Isotionato de fenamidina (15 - 20mg/kg, SC, a cada 24 horas [SID], durante dois dias), entre outros (Birkenheuer, 2013).

17. Ehrliquiose monocítica canina

17.1. Etiologia, Epidemiologia, Patogenia e Ciclo de Vida

Antigamente designada por rickettsiose canina ou tifo canino, a Ehrlichiose Monocítica Canina (EMC) é provocada pela *Ehrlichia canis* e adquiriu importância após a morte de centenas de cães militares americanos durante a Guerra do Vietname (Seixas *et al.*, 2011). A espécie *E. canis*, pertencente à ordem Rickettsiales, família Anaplasmataceae, género *Ehrlichia*, é uma pequena bactéria intracelular obrigatória do citoplasma de monócitos e

macrófagos (em forma de mórula), pleomórfica e gram-negativa (Stich *et al.*, 2008; Harrus, Waner & Neer, 2013; CVBD, 2014).

Este agente distribui-se essencialmente por zonas tropicais e temperadas, como África, América, Ásia e Europa mediterrânica. Os seus hospedeiros vertebrados incluem membros da família Canidae, como o chacal, raposa, coio e cão doméstico. O vetor responsável pela sua transmissão é o ixodídeo *Rhipicephalus sanguineus*, quer por via transtadial quer por via intraestadial. Qualquer estadio deste ixodídeo é capaz de se infetar e de transmitir *E. canis*, desde que se engorgite durante a fase aguda da doença no cão e que contenha um número suficiente de microrganismos. A ninfa e adulto transmitem *E. canis* durante pelo menos 155 dias após se soltarem do hospedeiro infetado (Seixas *et al.*, 2011; Harrus, Waner & Neer, 2013). Os ixodídeos adultos infetados são capazes de transmitir este microrganismo sem necessidade de cópula ou da presença de fêmeas (Bremer *et al.*, 2005). O PI da EMC é de 8 a 20 dias e divide-se numa fase aguda (1 a 4 semanas), subclínica (meses a anos) e crónica. Nem todos os animais passam pelo último estadio da doença. A espécie *E. canis* multiplica-se nos hemócitos e nas glândulas salivares das carraças infetadas. Após a picada no hospedeiro vertebrado, verifica-se uma migração de células mononucleares ao local de inoculação, o que pode acelerar a infeção dos monócitos com este agente (Seixas *et al.*, 2011; Harrus, Waner & Neer, 2013).

17.2. Sinais Clínicos, Diagnóstico e Tratamento

A apresentação clínica da EMC é variável e não se associa a sinais clínicos específicos (Breitschwerdt, 2004). Estes sinais são semelhantes na fase aguda e crónica, agravando-se nesta última. Os sinais clínicos mais comuns observados numa infeção aguda são depressão, letargia, anorexia, febre, linfadenomegália, esplenomegália e hemorragias (petéquias, equimoses e epistaxis) (Breitschwerdt, 2004; Harrus, Waner & Neer, 2013). Os sinais mais comuns numa infeção crónica são letargia, depressão, anorexia, caquexia, mucosas pálidas, febre, edema periférico, sinais oculares e neurológicos (Breitschwerdt, 2004; de Castro *et al.*, 2004). As manifestações oculares podem incluir uveíte ou posterior, cegueira, queratoconjuntivite, úlceras na córnea, hifema, glaucoma e descolamento da retina (Panciera, Ewing & Confer, 2001; Komnenou *et al.*, 2007). Os sinais neurológicos como, ataxia, estupor, hiperstesia, anisocoria, tremores, entre outros, geralmente associam-se a vasculite, meningite, lesões nos nervos centrais e periféricos, síndrome vestibular ou hemorragias (Harrus, Waner & Neer, 2013). Poliartrite e polimiosite também se observam na EMC (Neer, Breitschwerdt, Greene & Lappin, 2002).

O diagnóstico de erlichiose é baseado na combinação da anamnese, sinais clínicos, alterações hematológicas e diagnóstico serológico. No hemograma, pode identificar-se leucopénia, trombocitopénia bastante característica da fase aguda, anemia normocítica, normocrómica e não regenerativa. Outras alterações incluem hipoalbuminémia,

hiperproteinémia, hipergamaglobulinémia, aumento das transaminases e FAS, proteinúria e hematuria (Baneth, 2010; Harrus, Waner & Neer, 2013). A nível de diagnóstico laboratorial, a técnica de IFI é a mais usada e considerada o *gold standard*, indicando uma exposição ao agente. No entanto, existem reações cruzadas com outras espécies do género *Ehrlichia*, e por vezes *Anaplasma*, causando resultados falsos positivos (Harrus, Waner & Neer, 2013). Também são usadas técnicas como ELISA, o segundo teste sorológico mais usado, e WB, que faz a distinção entre *E. canis* e *E. ewingii*. Em alternativa à última, a técnica de PCR é também usada na prática clínica em caso de dúvida sobre qual o agente realmente envolvido (Rikihisa et al., 1992).

Os fármacos envolvidos num tratamento eficaz, incluem tetraciclinas, cloranfenicol e dipropionato de imidocarb (Neer et al., 2002; Harrus, Waner & Neer, 2013). A doxiciclina é o fármaco mais usado e é bastante eficiente a eliminar a riquetsiémia na fase aguda da infeção, na dose de 10 mg/Kg, PO, SID, durante 28 dias. Notam-se melhorias significativas entre 24 a 72 horas após iniciar o tratamento (Baneth, 2010; Harrus, Waner & Neer, 2013). Também é referido este fármaco, na mesma dosagem, em associação com o dipropionato de imidocarb, 5 mg/Kg, IM, em duas injeções separadas de 14 dias, como tratamento de 1ª escolha (Waner et al., 1999). O cloranfenicol (25-50 mg/Kg, SC/EV/IM, TID, durante 21 a 28 dias), a oxitetraciclina (7,5-10 mg/Kg, EV, TID, durante 21 a 28 dias) e o cloridrato de minociclina (10-20 mg/Kg, PO, BID, durante 21 a 28 dias), constituem alternativa aos fármacos anteriores (Waner et al., 1999; Harrus, Waner & Neer, 2013). Em 2012 surgiu a primeira vacina eficaz contra *E. canis* contendo uma estirpe atenuada (#611A), ainda não disponível no mercado (Rudoler et al., 2012).

18. Febre Botonosa Canina

18.1. Etiologia, Epidemiologia, Patogenia e Ciclo de Vida

Os organismos da espécie *Rickettsia conorii*, pertencentes ao género *Rickettsia* (Rickettsiales, Rickettsiaceae), são pequenas bactérias gram negativas intracelulares obrigatórias constituem uma importante causa de doenças infecciosas emergentes a nível mundial em humanos, afetando também o cão doméstico (Parola, Paddock & Raoult, 2005; Greene, Kidd & Breitschwerdt, 2013). Quanto à sua distribuição geográfica e vetores, é endémica na Europa, principalmente nos países mediterrânicos, Médio Oriente e África e o ixodídeo *Rhipicephalus sanguineus* é o seu principal vetor e hospedeiro reservatório (Shaw, Day, Birtles & Breitschwerdt, 2001), tendo sido no entanto demonstrado que o cão também é um hospedeiro reservatório deste hemoparasita (Levin, Killmaster, & Zemtsova, 2012).

O ixodídeo infeta-se durante uma refeição sanguínea realizada num hospedeiro com riquetsiémia. Os parasitas são depois transmitidos aos estádios evolutivos subsequentes ou à descendência. Quando as riquetsias são transmitidas de forma eficiente, tanto pela via

transtadial como transovárica, o ixodídeo serve de reservatório para a bactéria e a distribuição desta riquetsiose é idêntica à do seu vetor (Parola & Raoult, 2001).

A transmissão de *R. conorii* ao cão ocorre enquanto o vetor infetado se alimenta neste, mas para que se estabeleça uma infecção, é necessário que haja fixação do ixodídeo durante, no mínimo, entre 5 a 20 horas (Greene, Kidd & Breitschwerdt, 2013).

As riquetsias, após terem sido inoculadas, entram na circulação sanguínea e infetam as células endoteliais vasculares causando-lhes lesões, com consequente ativação do sistema de coagulação e fibrinolítico. Ocorre assim, vasculite necrozante, aumento da permeabilidade vascular e acumulação de fluidos nos tecidos (Parola, Paddock & Raoult, 2005; Greene, Kidd & Breitschwerdt, 2013).

18.2. Sinais Clínicos, Diagnóstico e Tratamento

O animal habitualmente possui como estímulo iatrotópico: letargia, anorexia, perda de peso, vômito e diarreia. Os sinais clínicos são variáveis e incluem hipertermia, hiperestesia, edema das extremidades, eritema, icterícia, linfadenomegália, hepatomegália, taquicardia, taquipneia, dispneia, claudicação, quemose, desidratação e até sinais neurológicos (Solano-Gallego *et al.*, 2006; Greene, Kidd & Breitschwerdt, 2013).

O diagnóstico assenta nos sinais clínicos e no diagnóstico laboratorial, no qual se verifica anemia, leucocitose com neutrofilia, trombocitopenia, hipoproteinemia e hipoalbuminemia, hiperglobulinemia, urémia, aumento das transaminases e proteína C reativa (Solano-Gallego *et al.*, 2006; Greene, Kidd & Breitschwerdt, 2013).

A detecção de Ac é a técnica mais usada para diagnóstico de riquetsioses na prática clínica. Existem vários métodos de detecção de anticorpos anti-*Rickettsia*, como a IFI, a Fixação de Complemento, o teste de Microaglutinação, a Aglutinação em Látex, o teste de ELISA, o WB, entre outros, mas nem todos podem ser realizados por laboratórios de rotina (Duarte, 2008). A IFI é o principal teste de diagnóstico utilizado em clínica, apesar de existirem reações cruzadas entre espécies do mesmo género. Já a técnica de PCR é sensível e específica para a detecção de *R. conorii* (Solano-Gallego *et al.*, 2006; Greene, Kidd & Breitschwerdt, 2013).

O tratamento farmacológico é considerado bacteriostático e qualquer um destes fármacos pode ser usado (Greene, Kidd & Breitschwerdt, 2013): Tetraciclina (22 mg/kg, PO/EV, TID, 7 a 14 dias); Doxiciclina (5 mg/kg, PO/EV, BID, 7 dias); Enrofloxacin (3 mg/kg, PO/SC, BID, 7 dias) e Cloranfenicol (25-50mg/kg, PO, TID, 7 dias). As tetraciclinas (doxiciclina), continuam a ser a melhor opção terapêutica para tratar as riquetsioses no cão (Holman *et al.*, 2001).

Capítulo III – Avaliação de duas técnicas serológicas (IFI e ELISA) e uma técnica molecular (qPCR em amostra de pele) no diagnóstico de infecção por *Leishmania infantum* em cães

1. Objetivos

Este estudo foi realizado em cães assistidos habitualmente no HEFMV, no período decorrido entre 9 de setembro de 2013 e 28 de fevereiro de 2014.

A necessidade de o Médico-Veterinário poder dispor de métodos de diagnóstico complementares confiáveis para o diagnóstico de várias doenças, levou ao desempenho deste estudo especialmente centrado na infecção por *Leishmania*/Leishmaniose.

Pretendeu-se: 1. Avaliar se diferentes doenças influenciam o resultado das técnicas de diagnóstico 2. Comparar a eficácia de duas técnicas serológicas (IFI e ELISA) para a deteção de anticorpos anti-*Leishmania* em quatro grupos de cães, a saber: A - Cães com Leishmaniose e simultaneamente infectados com agentes DCTV; B - Cães doentes com outras afeções - Doenças dermatológicas, Alterações oculares, Infecções Bacterianas, Tumores, Doenças endócrinas e DCTV (Babesiose, Erlichiose, Rickettsiose, excluindo Leishmaniose); C - Cães clinicamente saudáveis; D - Cães com Leishmaniose (com ou sem outras afeções); 3. Pesquisar DNA de *L. infantum* pela técnica molecular qPCR em amostras de pele, nos quatro grupos de cães acima referidos; 4. Avaliar a influência de factores como o sexo, a idade, o regime de habitação, o local onde vive, entre outros, na positividade para *L. infantum*.

2. Material e Métodos

2.1. Caracterização da amostra

Inicialmente foi delineado que o estudo teria no mínimo 40 animais subdivididos em 4 grupos de 10, mas tal não foi possível durante o referido período de estágio.

Foram selecionados cães assistidos no HEFMV que cumprissem inicialmente os seguintes critérios, especialmente para os grupos A e D: idade igual ou superior a um ano e não vacinados contra a Leishmaniose. Após realização do exame clínico e com base em exames complementares de diagnóstico realizados fora do âmbito deste estudo (análises sanguíneas, bioquímicas e urianálise realizadas nos laboratórios do HEFMV; proteinograma e pesquisa de hemoparasitas realizados pelo laboratório certificado (DNA Tech[®])), foram selecionados apenas, 39 cães subdivididos pelos seguintes grupos: A - Cães com Leishmaniose e simultaneamente infectados com agentes de outras doenças caninas transmitidas por vetores (7 cães); B - Cães doentes com outras afeções - Doenças dermatológicas, Alterações oculares, Infecções Bacterianas, Tumores, Doenças endócrinas e DCTV (Babesiose, Erlichiose, Rickettsiose, excluindo Leishmaniose) (10 cães); C - Cães clinicamente saudáveis (10 cães); D - Cães com Leishmaniose (com ou sem outras afeções) (12 cães).

A cada proprietário, durante a consulta, era pedida a sua autorização para a inclusão do animal neste estudo, por escrito, através do preenchimento de um termo de responsabilidade (Anexo I). Era igualmente apresentado um inquérito acerca do animal, registando-se dados como: sexo, idade, raça, tipo de pelagem, cidade onde habita, regime de habitação (interior, misto ou exterior), modo de aquisição do animal, cohabitação com outros animais, medidas de prevenção adotadas contra o inseto vetor, conhecimento acerca da doença, história clínica e sinais clínicos/sintomas presentes no animal (Anexo II).

2.2. Colheita e conservação das amostras

As colheitas de sangue e raspagens cutâneas profundas foram efetuadas durante a consulta após consentimento dos proprietários dos animais.

Para a recolha da amostra sanguínea, a partir da veia cefálica ou safena, foi realizada uma tricotomia local na zona a puncionar fazendo-se a antissépsia da mesma com álcool etílico a 70%. Colheram-se cerca de 2ml de sangue por animal, colocados num tubo seco para posterior obtenção do soro por centrifugação (1500 G, 10 minutos). Este soro foi congelado a -20°C até ser utilizado para a deteção de anticorpos específicos anti-*Leishmania* pelas técnicas de IFI e ELISA.

A obtenção da amostra de pele foi obtida através de uma raspagem profunda com uma lâmina de bisturi, na zona lateral do pescoço por trás de um dos pavilhões auriculares. De seguida, a amostra foi cuidadosamente transferida da lâmina do bisturi para o algodão de uma zaragatoa. Com vista a uma refrigeração a 4°C, a haste da zaragatoa foi quebrada de forma a caber num recipiente plástico estéril para conservação de amostras biológicas. Houve sempre o cuidado de efetuar a antisepsia da ferida induzida ao animal, no final deste procedimento, com uma solução de iodopovidona a 10%.

2.3. Métodos de diagnóstico

Para pesquisar a presença de infeção por *L.infantum* nos cães, recorreu-se a três técnicas de diagnóstico, sendo elas técnicas serológicas para pesquisa de anticorpos através das técnicas de IFI e de ELISA, realizadas no Laboratório de Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária (ULisboa) no período compreendido entre outubro de 2013 e fevereiro de 2014, e uma técnica de biologia molecular, qPCR, para detetar DNA parasitário, realizado no Laboratório de Virologia da FMV - ULisboa.

2.3.1. Técnicas Serológicas

2.3.1.1. Pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* por IFI

Esta técnica foi realizada sob a orientação da Professora Doutora Isabel Pereira da Fonseca e da Dr^a Lídia Gomes, auxiliar no mesmo. Utilizou-se a titulação 1:80 como limiar de positividade, de acordo com o fabricante. Este limite de positividade ou limiar de diluição

varia consoante o laboratório e os métodos utilizados (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008). Nesta técnica, os *pool* de soros controlo de cães positivos e negativos usados pertenciam à seroteca do Laboratório de Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária (ULisboa). É importante referir que também não faremos distinção entre um resultado positivo fraco ou positivo, apenas diremos “positivo”.

Para a realização desta técnica utilizou-se o Kit *Leishmania*-Spot IF (Laboratório BioMérieux[®], França) (Figura 10), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante:

1. Retirar as lâminas com o antigénio fixado, do frigorífico e colocar à temperatura ambiente, durante 15 minutos.
2. Preparar o tampão fosfato salino (PBS), diluindo um frasco de PBS (BioMérieux[®], França, Ref. 75 511) em 1 L de água destilada, agitar bem e conservar num frasco escurecido.
3. Preparar o PBS/Tween 80, através da junção de 0,5 mL de Tween 80 (Merck[®], Alemanha, Ref. 822 187) a 1 L de PBS.
4. Descongelar as amostras de soro à temperatura ambiente.
5. Homogeneizar as amostras recorrendo ao agitador.
6. Numa microplaca de titulação (Figura 11), depositar 195 µL de PBS no número de poços correspondente ao número de soros a testar (colunas 1 e 3).
7. Depositar 50 µL de PBS nos poços da coluna seguinte (coluna 2).
8. Depositar 5 µL de cada soro que se quer testar no respetivo poço das colunas 1 e 3, contendo o PBS e pipetar suavemente para melhor os homogeneizar, obtendo-se então uma diluição 1:40.
9. Com uma micropipeta contendo o volume de 50 µL:
 - a) Passar 50 µL da coluna 1 para a coluna 2, obtendo-se a diluição 1:80 (limiar de positividade ou *cut-off*) nos poços da coluna 2;
 - b) Repetir este passo para a coluna 3.
10. Com a micropipeta retirar 10 µL de cada poço e colocar no respetivo poço da lâmina contendo o antigénio (Figura 12), no último poço de cada lâmina colocar 10 µL de controlo negativo (soro de um cão com resultado negativo) (poço 5) e 10 µL de controlo positivo (soro de um cão com resultado positivo) (poço 10);
11. Incubar durante 30 minutos a 37 °C, em câmara húmida.
12. Lavar as lâminas com uma 1ª lavagem rápida de 1 ou 2 segundos, com PBS/Tween 80.
13. Fazer uma segunda lavagem das lâminas mergulhando as lâminas num recipiente com PBS/Tween 80 durante 5 minutos.
14. Fazer uma terceira lavagem das lâminas mergulhando as lâminas em outro recipiente com PBS/Tween 80 durante 5 minutos.
15. Fazer uma última lavagem rápida das lâminas utilizando um banho água destilada.

16. Secar bem as lâminas com o auxílio de um secador de cabelo.
 17. Depositar 10 µL de conjugado fornecido no Kit em cada um dos poços da lâmina.
 18. Voltar a incubar durante 30 minutos a 37 °C, em câmara húmida.
 19. Repetir os passos 12 a 16.
 20. Colocar uma gota de solução de paragem de reação Fluoprep (BioMérieux® França, Ref. 75 511) contendo glicerina tamponada (1:10), em cada poço de cada lâmina e uma lamela 50x24 mm por cima de cada lâmina.
- A observação foi feita em microscópio de fluorescência (Olympus DP10, Modelo BX50F) (Figura 13), no comprimento de onda de 425 nm. Os poços contendo amostras positivas apresentam promastigotas de cor verde fluorescente e os negativos promastigotas de cor vermelha.

Figura 10 – **Kit *Leishmania*-Spot IF (Laboratório bioMérieux®, França).**



Figura 11 – **Microplaca de titulação.**



Figura 12 - **Lâminas com antígeno fixado, antes da incubação.**



Figura 13 – **Olympus DP10, Modelo BX50F.**



2.3.1.2. Pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* pela técnica de ELISA

Esta técnica foi igualmente realizada sob a orientação da Professora Doutora Isabel Pereira da Fonseca e da Dr^a Lídia Gomes. Utilizou-se o *kit* LEISCAN® LEISHMANIA ELISA TEST (Figura 14), fabricado pelos LABORATORIOS HIPRA, S.A. e gentilmente cedido pela ESTEVE FARMA, de acordo com as instruções do fabricante.

**Figura 14 – Kit LEISCAN®
LEISHMANIA ELISA TEST**



1. Preparações prévias:

1.1. Colocar todos os reagentes à temperatura ambiente 10 minutos, antes de proceder à realização do ensaio (Figura 15).

1.2. Preparar a “Solução de lavagem diluída”: Diluir 1 volume da solução de lavagem (frasco Nº 0) em 19 volumes de água destilada. Se a lavagem for manual, são necessários 4 mL de solução de lavagem diluída por cada poço a utilizar. A solução reconstituída pode armazenar-se 4 semanas entre 2-8 °C.

1.3. Preparação das amostras: Diluir a 1:20 as amostras com o Diluente de Amostras (frasco Nº 1), misturando 10 µL de amostra com 190 µL de Solução Diluente de Amostras. Os controlos (positivo alto, positivo baixo e negativo) são fornecidos diluídos, prontos a utilizar.

2. Retirar a película protetora que cobre os poços apenas quando estes vão ser utilizados. Colocar 100 µL da amostra diluída ou controlo em cada poço. Agitar suavemente 15 segundos. Em todas as colunas é recomendado no mínimo um controlo por coluna de placa para verificar a validade dos resultados.

3. Incubar 10 minutos à temperatura ambiente (20-25°C).

4. Eliminar o conteúdo dos poços e lavar 5 vezes com aproximadamente 300 µl por poço de solução de lavagem diluída.

5. Juntar 100 µL de conjugado (frasco Nº 2) a cada poço. Agitar suavemente 15 segundos.

6. Incubar 5 minutos à temperatura ambiente (20-25 °C).

7. Repetir o passo 4.

8. Juntar 100 µL de Substrato (frasco Nº 3) a cada poço. Agitar suavemente 10 segundos.

9. Incubar 10 minutos no escuro à temperatura ambiente (20-25 °C).

10. Juntar 100 µL de Solução de Paragem (frasco Nº 4) a cada poço (Figura 16).

11. Ler as densidades óticas num leitor ELISA com um filtro de 450 nm. No presente caso, no espectrofotómetro com monocromador da marca SPECTRA MAX[®], modelo 340 PC (Figura 17).

12. Calcular os resultados:

$$\text{Razão (RZ) da amostra} = \frac{\text{Densidade Ótica (D.O.) da Amostra}}{\text{D.O. Controlo Positivo Baixo}}$$

13. Interpretar os resultados (Figura 18).

Figura 15 – Conjunto de reagentes pertencentes ao kit LEISCAN® LEISHMANIA ELISA TEST



Figura 16 – Aspeto dos poços já com a Solução de Paragem adicionada (Passo 10).

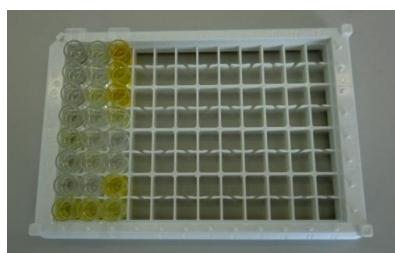


Figura 17 – Espectrofotómetro com monocromador da marca SPECTRA MAX®, modelo 340 PC (Passo 11).



Figura 18 – Interpretação dos resultados do kit LEISCAN® LEISHMANIA ELISA TEST, de acordo com o fabricante.

Razão(Rz) da amostra	Resultado	Correspondência IFI
Razão da amostra < 0,5	Negativo	Negativo
0,5 < Rz. < 0,7	Negativo	1/20 a 1/40
0,7 < Rz. < 0,9	Negativo	1/40 a 1/80
0,9 < Rz. < 1,1	Duvidoso	1/80
1,1 < Rz. < 1,5	Positivo Baixo	1/80 a 1/160
1,5 < Rz.	Positivo	>1/160

2.3.2. Técnicas Moleculares

2.3.2.1. Pesquisa de DNA de *Leishmania infantum* em amostras de raspagem cutânea pela técnica molecular de qPCR

As amostras foram processadas pela autora, sob orientação da Professora Doutora Ana Duarte e da Dr^a Clara Cartaxeiro, juntamente com o auxílio do Mestre Marcos Santos, bolseiro FCT no Laboratório de Doenças Parasitárias da FMV-ULisboa.

Para o processamento das amostras utilizaram-se os seguintes protocolos:

a) Extração de DNA total a partir de amostra de pele com o *Kit* de extração DNeasy Blood & Tissue Kit[®] (Qiagen, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente o protocolo incluiu os seguintes passos:

1. Homogenizar o produto de cada zaragatoa em 200 µL de PBS.
2. Adicionar a cada amostra, 200 µL de tampão ATL, para promover a lise.
3. Adicionar a cada amostra, 20 µL de enzima proteínase K, a fim de promover a digestão proteica das amostras.
4. Homogenizar bem no vórtex, durante uns segundos.
5. Colocar em banho seco à temperatura de 56°C, durante 3 horas, para lisar as células.
6. Retirar as amostras já incubadas, adicionar 200 µL de tampão AL e homogeneizar novamente através do vórtex.
7. Adicionar a cada amostra 200 µL de etanol a 100% e homogeneizar, para precipitação do DNA.
8. Aplicar as amostras em colunas DNeasy.
9. Centrifugar a coluna a 6000 x g (correspondente a 8000 rpm), durante 1 minuto. Transferir as colunas para novos tubos coletores e repetir este passo o número de vezes que for necessário até esgotar a amostra.
10. Adicionar 500 µL de tampão AW1. Centrifugar a 6000 xg, durante 1 minuto.
11. Adicionar 500 µL de tampão AW2. Centrifugar a 6000 xg, durante 1 minuto.
12. Centrifugar novamente a coluna sem tampão, nas mesmas condições, para retirar o excesso de etanol.
13. Identificar novos tubos Eppendorf, com data e número da amostra e transferir as colunas respetivas. Adicionar 60 µL do tampão de eluição AE, para eluir o DNA fixo na coluna. Deixar atuar 1 minuto à temperatura ambiente, para melhor hidratar a amostra. Centrifugar a 8000 rpm, durante 1 minuto.
14. Rejeitar as colunas DNeasy ficando apenas com o tubo Eppendorf previamente identificado. Colocar as amostras num congelador a - 20°C.

b) PCR em tempo real (qPCR) para deteção de *Leishmania infantum*

A deteção de ácidos nucleicos do cinetoplasto de *Leishmania infantum* foi efetuada no Laboratório de Virologia da FMV-ULisboa, através da técnica de qPCR.

Nesta técnica foi utilizada uma sonda Taqman[®], que consiste numa sequência nucleotídica que hibrida com a região alvo e que possui na sua extremidade 5' uma molécula *reporter* (FAM[™]) e na extremidade 3' uma molécula *quencher* (TAMRA[™]) (FAM 5' – AAT TCC AAA CTT TTC TGG TCC TCC GGG TAG – 3' TAMRA). Relativamente aos primers, o *Fwr-Primer* apresenta a sequência 5'- GGA AGG TGT CGT AAA TTC TGG AA -3' e o *Rev-Primer* a sequência 5'- CGG GAT TTC TGC ACC CAT T -3' (Mortarino *et al.*, 2004; Helhazar, Leitão, Duarte, Tavares & Pereira da Fonseca, 2013).

A reação foi realizada num volume final de 20 µL, com o tampão de reação TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems®), 0,3 µM de cada *primer*, 0,250 µM de sonda TaqMan® e 2 µL de amostra. Como controlo positivo foi utilizado um plasmídeo recombinante pGEM® (Promega, Portugal) (Laboratório de Virologia da FMV-UL) que incluía a região a amplificar, a partir do qual foram feitas diluições seriadas na base 10 (10^{-1} a 10^{-12}) de forma a gerar uma reta padrão constituída por oito pontos. Como controlo negativo recorreu-se ao uso de água Milli-Q estéril. A amplificação foi efetuada no termociclador 7300 - Applied Biosystems®.

As condições utilizadas para a amplificação do fragmento de DNA contendo 124 pares de bases, foram: 10 min a 95°C para uma desnaturação inicial e ativação da enzima DNA polimerase, seguida de 50 ciclos: 15 segundos a 90°C para nova desnaturação e 1 minuto a 60°C para ligação dos “*primers*” (*annealing*) e para o processo de extensão (Helhazar *et al*, 2013).

O valor de Ct (“*Threshold cycle*”) resulta da interseção entre a curva de amplificação e o limiar (“*Threshold line*”) (linha verde horizontal observada no Gráfico 5). É uma medida relativa da concentração da molécula alvo na reação de qPCR e consiste num número fraccional do ciclo no qual a fluorescência passa o limiar. Ou seja, é o número do ciclo em que se deteta aumento de fluorescência. Quanto maior for a amostra de DNA, mais brevemente o produto acumulado é detetado, emitindo fluorescência e mais baixo será o valor de Ct. Os valores de Ct correspondentes às diluições seriadas do plasmídeo encontram-se na Tabela 8.

A reta padrão elaborada a partir de diluições seriadas de plasmídeo e respetivas reações de qPCR, encontra-se no gráfico 6, onde é apresentada a respetiva equação da reta e o coeficiente de determinação (R^2), assim como o desvio padrão de cada ponto.

Tabela 8 – Diluições seriadas do controlo positivo [plasmídeo recombinante pGEM® (Promega, Portugal)] e os respetivos valores de C_T (Procedimento realizado pelo Mestre Marcos Santos).

Diluições seriadas (nº de moléculas/µL)	Valor C_T
$1,6 \times 10^{12}$	-
$1,6 \times 10^{11}$	7,73
$1,6 \times 10^{10}$	10,21
$1,6 \times 10^9$	11,85
$1,6 \times 10^8$	14,91
$1,6 \times 10^7$	18
$1,6 \times 10^6$	21,63
$1,6 \times 10^5$	25,94
$1,6 \times 10^4$	28,77
$1,6 \times 10^3$	32,82
$1,6 \times 10^2$	33
$1,6 \times 10^1$	39,09

Gráfico 5 – Reação de qPCR com as curvas *standard* das diluições seriadas do plasmídeo e os seus respectivos valores de C_T .

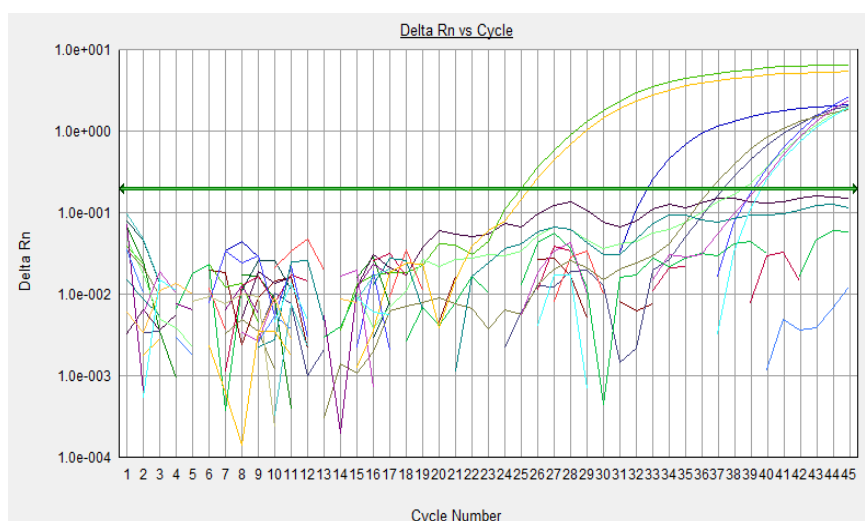
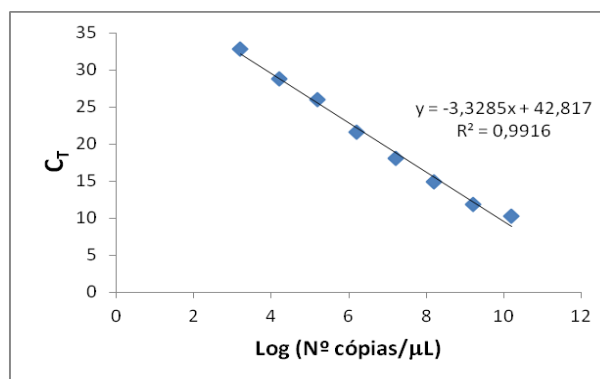


Gráfico 6 – Reta padrão elaborada a partir de diluições seriadas de plasmídeo e respectivas reações de qPCR. É apresentada a respetiva equação da reta e o coeficiente de determinação (R^2), assim como o desvio padrão de cada ponto.



2.4. Análise estatística dos resultados

Os resultados da pesquisa de infecção por *Leishmania* por 3 técnicas de diagnóstico, em 4 grupos de cães, foram sujeitos a uma análise estatística com recurso a certos programas informáticos e testes estatísticos (Teste exato de Fisher). Os dados foram armazenados no Software Microsoft Excel 2007[®], e para a realização da referida análise recorreu-se aos seguintes programas informáticos: Microsoft Excel 2007[®], R 3.1.1.[®] e a ferramenta EpiTools (AusVet Animal Health Services[®]).

Dada a pequena dimensão da amostra populacional usada neste trabalho (N=39), executou-se o Teste exato de Fisher.

Os resultados dos testes estatísticos foram considerados significativos quando o valor de p (significância) foi menor que 0,05, com um intervalo de confiança de 95%.

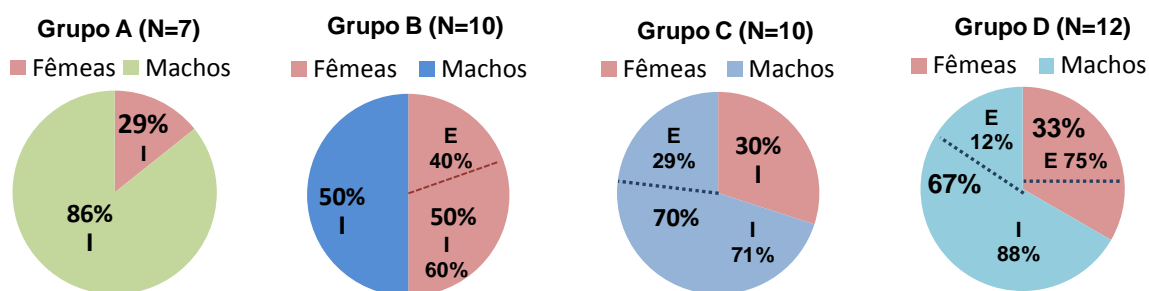
3. Resultados

3.1. Caracterização da amostra de acordo com as respostas obtidas no inquérito realizado aos proprietários dos cães e exames complementares de diagnóstico

A população dos 39 animais incluiu machos e fêmeas, esterilizados ou inteiros (Gráficos 7, 8, 9 e 10), com idades compreendidas entre um e treze anos (Gráficos 11, 12, 13 e 14), de diversas raças (Tabela 9), com diferentes tipos de pelagem (Gráficos 15, 16, 17 e 18) e porte (Gráficos 19, 20, 21 e 22), proveniência (Gráficos 23, 24, 25 e 26), local de habitação (Gráficos 27, 28, 29 e 30), distribuídos por certos concelhos da Região Metropolitana de Lisboa, zonas norte e sul do país (Gráficos 31, 32, 33 e 34), realizando um certo número de passeios diários (Gráficos 35, 36, 37 e 38), entre outros fatores. Todos os resultados do estudo se encontram resumidos nas tabelas presentes no Anexo III.

Sexo: Os gráficos 7, 8, 9 e 10 ilustram a frequência relativa (%) da distribuição dos animais dos quatro grupos pelos dois sexos.

Gráficos 7, 8, 9 e 10 - Frequência relativa (%) da distribuição dos animais por grupos e por sexo.

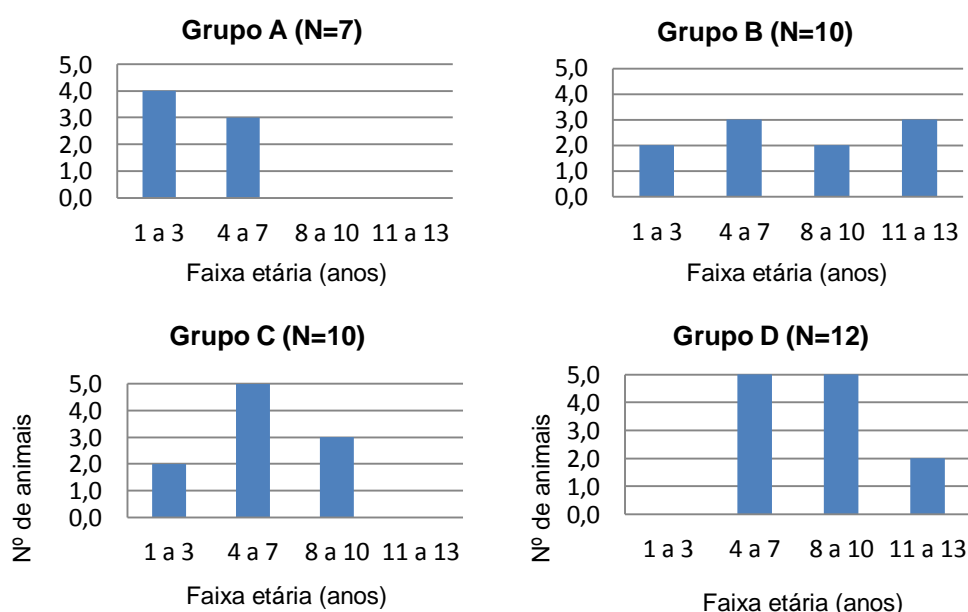


Legenda: A - Cães com Leishmaniose e simultaneamente infectados com agentes de outras DCTV; B - Cães com afeções (excluindo Leishmaniose); C - Cães clinicamente saudáveis; D - Cães com Leishmaniose (com ou sem outras afeções); I - inteiros; E - esterilizados.

No Grupo A, 86% (6 /7) eram machos, dos quais 100% (6/6) inteiros, e 14% (1/7) fêmeas, das quais 100% (1/1) eram inteiras. No Grupo B, 50% (5/10) eram machos, dos quais 100% (5/5) eram inteiros, e 50% (5/5) eram fêmeas, das quais 60% (3/5) eram inteiras. No Grupo C, 70% (7/10) eram machos, dos quais 71% (5/7) inteiros, e 30% (3/10) eram fêmeas, das quais 100% (3/3) estavam esterilizadas. Por fim, no Grupo D, 67% (8/12) eram machos, dos quais 88% (7/8) eram inteiros, e 33% (4/12) eram fêmeas, das quais 75% (3/4) eram inteiras.

Idade: Os gráficos 11,12,13 e 14 ilustram a frequência relativa (%) da distribuição dos animais dos quatro grupos pelas quatro faixas etárias.

Gráficos 11,12,13 e 14 - Frequência relativa (%) da distribuição dos animais por grupos e por faixa etária.



Legenda: **A** - Cães com Leishmaniose e simultaneamente infectados com agentes de outras DCTV; **B** - Cães com afeções (excluindo Leishmaniose); **C** - Cães clinicamente saudáveis; **D** - Cães com Leishmaniose (com ou sem outras afeções).

No Grupo A existiam quatro cães com idades compreendidas entre 1 - 3 anos de idade e três cães com idades compreendidas entre os 4 - 7 anos. No Grupo B existiam dois cães entre 1 - 3 anos, três cães entre os 4 - 7 anos, dois cães entre os 8 - 10 anos e três cães entre os 11 - 13 anos. No Grupo C existiam dois cães entre 1 - 3 anos, cinco cães entre os 4 - 7 anos e três animais entre os 8 - 10 anos. No Grupo D existiam cinco cães entre os 4 - 7 anos, cinco cães entre os 8 - 10 anos e dois cães entre os 11 e 13 anos.

Raças: A Tabela 9 ilustra a distribuição dos animais dos quatro grupos pelas diversas raças consultadas e integradas no estudo.

Tabela 9 - Distribuição dos animais por grupos e por raça.

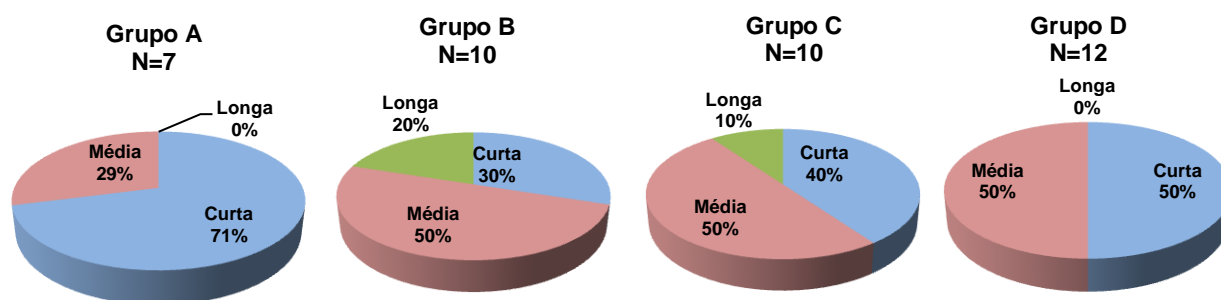
Grupos	Raças (Nº de cães)
A N=7	Sem Raça Definida (SRD) (2); Boerboel (1); Dogue Alemão (1); Golden Retriever (1); Terranova (1); Weimaraner (1).
B N=10	SRD (4); Cavalier King Charles Spaniel (1); Jack Russel Terrier (1); Retriever do Labrador (2); Epagneul Bretão (1); Yorkshire Terrier (1).
C N=10	SRD (4); Baixote (1); Boxer (1); Bulldog Francês (1); Podengo Português Médio (1); Retriever do Labrador (1); Yorkshire Terrier (1).
D N=12	SRD (5); Siberian Husky (1); Cão de Pastor Alemão (3); Pit Bull (1); Retriever do Labrador (2).

Legenda: **A** - Cães com Leishmaniose e simultaneamente infectados com agentes de outras DCTV; **B** - Cães com afeções (excluindo Leishmaniose); **C** - Cães clinicamente saudáveis; **D** - Cães com Leishmaniose (com ou sem outras afeções).

No Grupo A, existiam 29% (2/7) cães SRD, 14% (1/7) de raça Boerboel, 14% (1/7) de raça Dogue Alemão, 14% (1/7) de raça Golden Retriever, 14% (1/7) de raça Terranova e 14% (1/7) de raça Weimaraner. No Grupo B, existiam 40% (4/10) cães SRD, 10% (1/10) de raça Cavalier King Charles Spaniel, 10% (1/10) de raça Jack Russel Terrier, 20% (2/10) de raça Retriever do Labrador, 10% (1/10) de raça Epagneul Bretão e 10% (1/10) de raça Yorkshire Terrier. No Grupo C, existiam 40% (4/10) cães SRD, 10% (1/10) de raça Baixote, 10% de raça Boxer, 10% (1/10) de raça Bulldog Francês, 10% (1/10) de raça Podengo Português Médio, 10% (1/10) de raça Retriever do Labrador e 10% (1/10) de raça Yorkshire Terrier. No Grupo D, existiam 42% (5/12) cães SRD, 8% (1/12) de raça Siberian Husky, 25% (3/12) de raça Cão de Pastor Alemão, 8% (1/12) de raça Pit Bull e 17% (2/12) de raça Retriever do Labrador.

Pelagem: Os gráficos 15,16,17 e 18 ilustram a frequência relativa (%) da distribuição dos animais dos quatro grupos relativamente ao comprimento da pelagem.

Gráficos 15,16,17 e 18- **Frequência relativa (%) da distribuição dos animais por grupos e por comprimento da pelagem.**

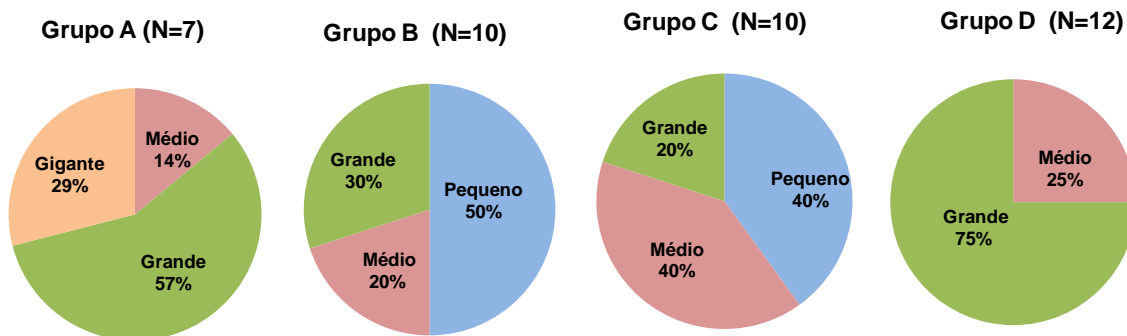


Legenda: **A** - Cães com Leishmaniose e simultaneamente infectados com agentes de outras DCTV; **B** - Cães com afeções (excluindo Leishmaniose); **C** - Cães clinicamente saudáveis; **D** - Cães com Leishmaniose (com ou sem outras afeções).

No Grupo A 71% (5/7) dos cães tinham a pelagem curta e os restantes 29% (2/7) pelagem de tamanho médio. No Grupo B 30% (3/10) tinham pelagem curta, 50% (5/10) pelagem média e 20% (2/10) pelagem longa. No Grupo C 50% (5/10) dos cães tinham pelagem média, 40% (4/10) pelagem curta e 10% (1/10) pelagem longa. No Grupo D metade (6/12) tinham pelagem curta e a restante metade (6/12) pelagem média.

Porte: Os gráficos 19, 20, 21 e 22 ilustram a frequência relativa (%) da distribuição dos animais dos quatro grupos relativamente ao seu porte que apresentavam.

Gráficos 19, 20, 21 e 22 - Frequência relativa (%) da distribuição dos animais por grupos e por porte.

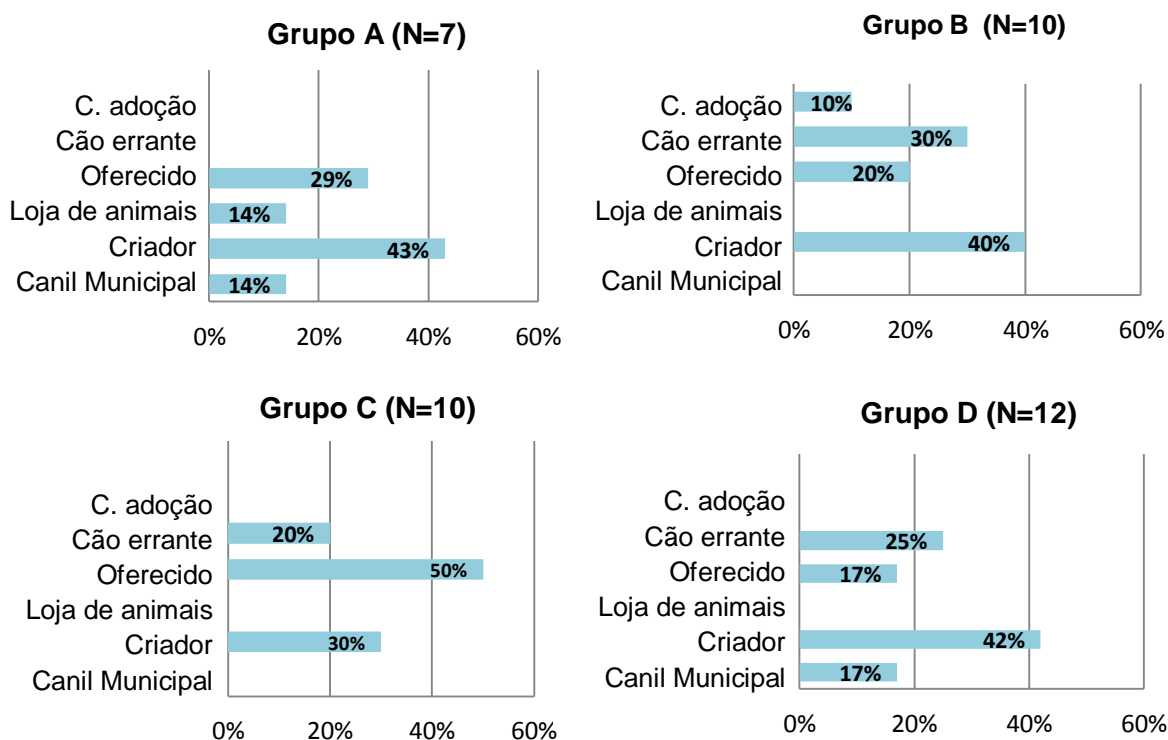


Legenda: **A** - Cães com Leishmaniose e simultaneamente infectados com agentes de outras DCTV; **B** - Cães com afeções (excluindo Leishmaniose); **C** - Cães clinicamente saudáveis; **D** - Cães com Leishmaniose (com ou sem outras afeções).

No Grupo A 29% (2/7) eram de porte gigante, 57% (4/7) de grande porte e 14% (1/7) de pequeno porte. No Grupo B 30% (3/10) eram de porte grande, 20% (2/10) de porte médio e 50% (5/10) de porte pequeno. No Grupo C 20% (2/10) eram de porte grande, 40% (4/10) de porte médio e 40% (4/10) de pequeno porte. No Grupo D 75% (9/12) eram de porte grande e 25% (3/12) de porte médio.

Proveniência: Os gráficos 23, 24, 25 e 26 ilustram a frequência relativa (%) da distribuição dos animais dos quatro grupos relativamente à proveniência (canil municipal/ criador/ campanha de adoção/oferta/ cão errante/ loja de animais).

Gráficos 23, 24, 25 e 26 - Frequência relativa (%) da distribuição dos animais por grupos e por proveniência.

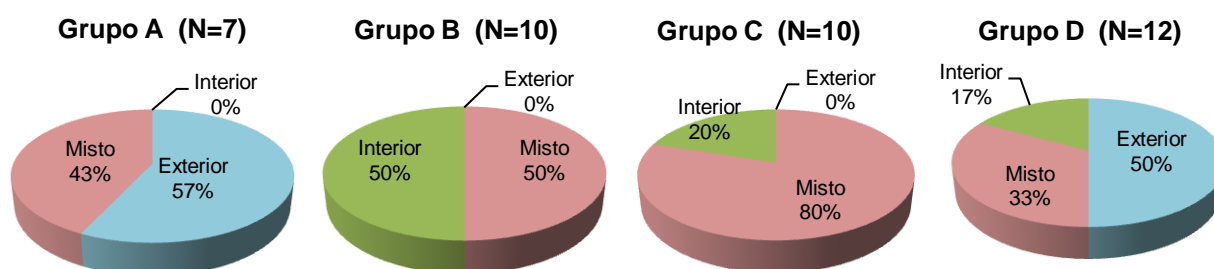


Legenda: **A** - Cães com Leishmaniose e simultaneamente infectados com agentes de outras DCTV; **B** - Cães com afeções (excluindo Leishmaniose); **C** - Cães clinicamente saudáveis; **D** - Cães com Leishmaniose (com ou sem outras afeções); C. adoção - Campanha de adoção.

A maior parte dos cães do Grupo A foi comprado num criador (43%, 3/7), 29% (2/7) foram oferecidos aos proprietários e os restantes foram resgatados do canil municipal (14%, 1/7) e adquiridos numa loja de animais (14%, 1/7). No Grupo B 40% (4/10) dos cães foram adquiridos num criador, 30% (3/10) foram resgatados na via pública, 20% (2/10) foram oferecidos aos seus proprietários e os restantes 10% (1/10) adquiridos em campanhas de adoção. No Grupo C, 50% (5/10) foram oferecidos, 30% (3/10) comprados num criador e 20% (2/10) foram resgatados da vida errante. No Grupo D a maioria foi adquirida em criadores (42%, 5/12), seguida pelo resgate de cães errantes (25%, 3/12), oferta ao proprietário (17%, 2/12) e resgate do canil municipal (17%, 2/12).

Local de Habitação: Os gráficos 27, 28, 29 e 30 ilustram a frequência relativa (%) da distribuição dos animais dos quatro grupos relativamente ao seu local de habitação.

Gráficos 27, 28, 29 e 30 - **Frequência relativa (%) da distribuição dos animais por grupos e por local de habitação.**

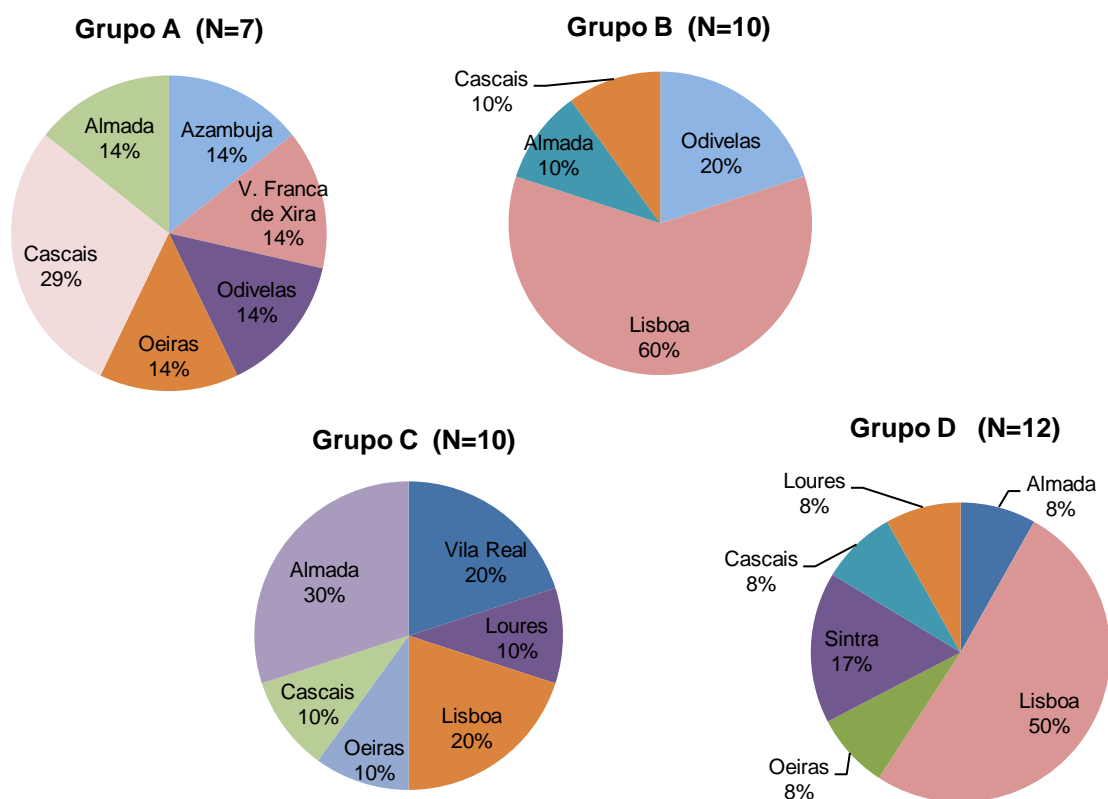


Legenda: **A** - Cães com Leishmaniose e simultaneamente infectados com agentes de outras DCTV; **B** - Cães com afeções (excluindo Leishmaniose); **C** - Cães clinicamente saudáveis; **D** - Cães com Leishmaniose (com ou sem outras afeções).

No Grupo A, 57% (4/7) dos cães habitava no exterior e 43% (3/7) em regime misto. No Grupo B, 50% (5/10) viviam no exterior e os outros 50% em regime misto. No Grupo C, 80% (8/10) habitavam em regime misto e 20% (2/10) no interior. No Grupo D, 50% (6/12) habitavam no exterior, 33% (4/12) em regime misto e 17% (2/12) no interior.

Concelho de Residência: Os gráficos 31, 32, 33 e 34 ilustram a frequência relativa (%) da distribuição dos animais dos quatro grupos relativamente ao concelho de residência.

Gráficos 31, 32, 33 e 34 - **Frequência relativa (%) da distribuição dos animais por grupos e por concelho de residência.**

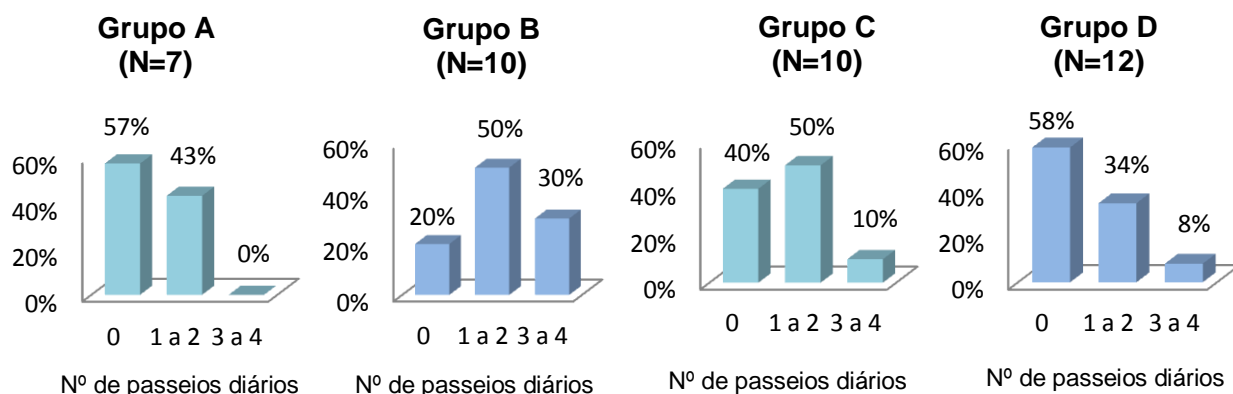


Legenda: **A** - Cães com Leishmaniose e simultaneamente infectados com agentes de outras DCTV; **B** - Cães com afeções (excluindo Leishmaniose); **C** - Cães clinicamente saudáveis; **D** - Cães com Leishmaniose (com ou sem outras afeções).

Os cães do Grupo A distribuíram-se 14% (1/7) pelos concelhos de Azambuja, 14% (1/7) por Vila Franca de Xira, 14% (1/7) por Odivelas, 14% (1/7) por Oeiras, 14% (1/7) por Cascais e 14% (1/7) por Almada, os restantes 29% (2/7) por Cascais. No Grupo B 60% (6/10) viviam em Lisboa, 20% (2/10) em Odivelas, 10% (1/10) em Cascais e os restantes 10% (1/10) em Almada. No Grupo C 30% (3/10) viviam em Almada, 20% (2/10) em Vila Real, 20% (2/10) em Lisboa, 10% (1/10) em Loures, 10% (1/10) em Oeiras e 10% (1/10) em Cascais. No Grupo D 50% (6/12) viviam no concelho de Lisboa, 17% (2/12) em Sintra, e a restante população distribui-se por Almada, Loures, Cascais e Oeiras com uma percentagem de 8% (1/12) por concelho.

Número de Passeios Diários: Os gráficos 35, 36, 37 e 38 ilustram a frequência relativa (%) da distribuição dos animais dos quatro grupos relativamente ao nº de passeios diários que realizam com os seus proprietários.

Gráficos 35, 36, 37 e 38 - Frequência relativa (%) da distribuição dos animais por grupos e por nº de passeios diários.

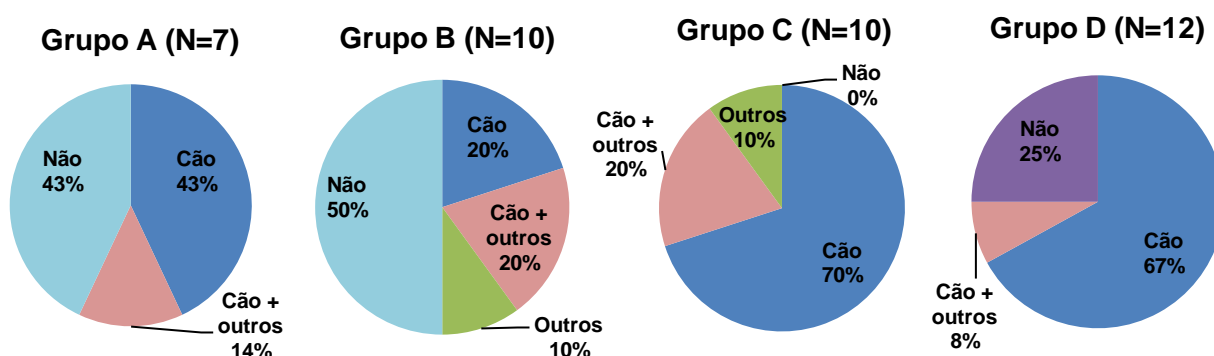


Legenda: **A** - Cães com Leishmaniose e simultaneamente infectados com agentes de outras DCTV; **B** - Cães com afeções (excluindo Leishmaniose); **C** - Cães clinicamente saudáveis; **D** - Cães com Leishmaniose (com ou sem outras afeções).

Relativamente ao número de passeios diários, agrupados em três categorias, no Grupo A, 57% (4/7) não realizavam nenhum passeio e 43% (3/7) realizavam entre 1 a 2 passeios diários. No Grupo B, 20% (2/10) não realizavam passeios, 50% (5/10) realizavam 1 a 2 passeios e 30% (3/10) 3 a 4 passeios. No Grupo C, 40% (4/10) não realizava passeios, 50% (5/10) realizava entre 1 a 2 passeios e 10% (1/10) 3 a 4 passeios diários. No Grupo D, 58% (7/12) não efetuavam passeios, 34% (4/12) efetuavam 1 a 2 passeios e 8% (1/12) efetuavam 3 a 4 passeios por dia.

Cohabitação com outros animais: Os gráficos 39, 40, 41 e 42 ilustram a frequência relativa (%) da distribuição da coabitação dos animais dos quatro grupos com outros animais (outros cães, gatos, animais exóticos).

Gráficos 39, 40, 41 e 42 - Frequência relativa (%) da distribuição dos animais por grupos e coabitação com outros animais.



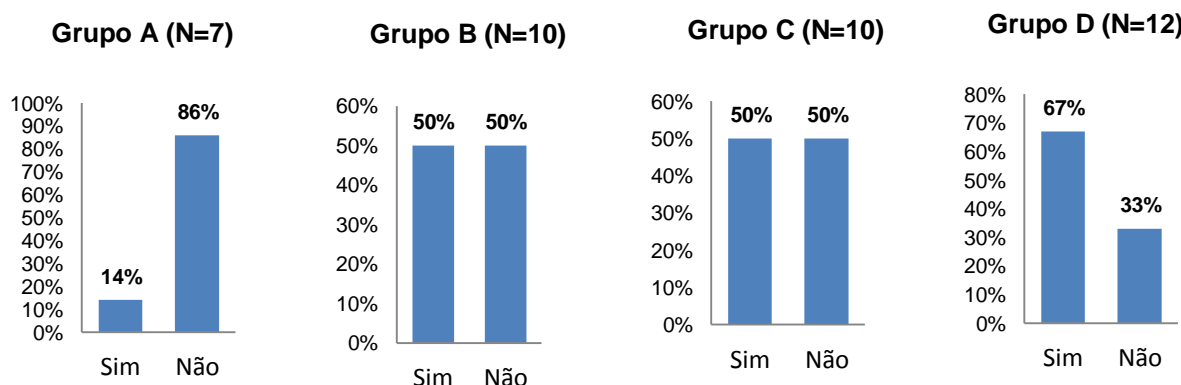
Legenda: **A** - Cães com Leishmaniose e simultaneamente infectados com agentes de outras DCTV; **B** - Cães com afeções (excluindo Leishmaniose); **C** - Cães clinicamente saudáveis; **D** - Cães com Leishmaniose (com ou sem outras afeções); outros - gatos ou animais exóticos.

Quanto à cohabitação com outros cães e animais de outras espécies (gatos ou animais exóticos), no Grupo A, 43% (3/7) da população cohabitava com outros cães, 14% (1/7) cohabitava simultaneamente com cães e aves, 43% (3/7) não cohabitava com outros animais. No Grupo B, 20% (2/10) cohabitava com outros cães, 20% (2/10) cohabitava simultaneamente com cães e gatos, 10% (1/10) cohabitava com gatos e 50% (5/10) da população não cohabitava com outros animais. No Grupo C, 70% (7/10) cohabitavam com outros cães, 20% (2/10) cohabitavam simultaneamente com cães e outros animais (chinchila) e 10% (1/10) cohabitavam com outros animais (aves e peixes). No Grupo D, 67% (8/12) cohabitavam com outros cães, 8% (1/12) cohabitavam simultaneamente com cães e outros animais (réptil) e 25% (3/12) não cohabitavam com outros animais.

Deslocação por Portugal e Estrangeiro

a) Portugal - Os gráficos 43, 44, 45 e 46 ilustram a frequência relativa (%) dos animais que se deslocavam por Portugal.

Gráficos 43, 44, 45 e 46 - **Frequência relativa (%) da distribuição dos animais por grupos quanto à deslocação por Portugal.**



Legenda: **A** - Cães com Leishmaniose e simultaneamente infectados com agentes de outras DCTV; **B** - Cães com afeções (excluindo Leishmaniose); **C** - Cães clinicamente saudáveis; **D** - Cães com Leishmaniose (com ou sem outras afeções).

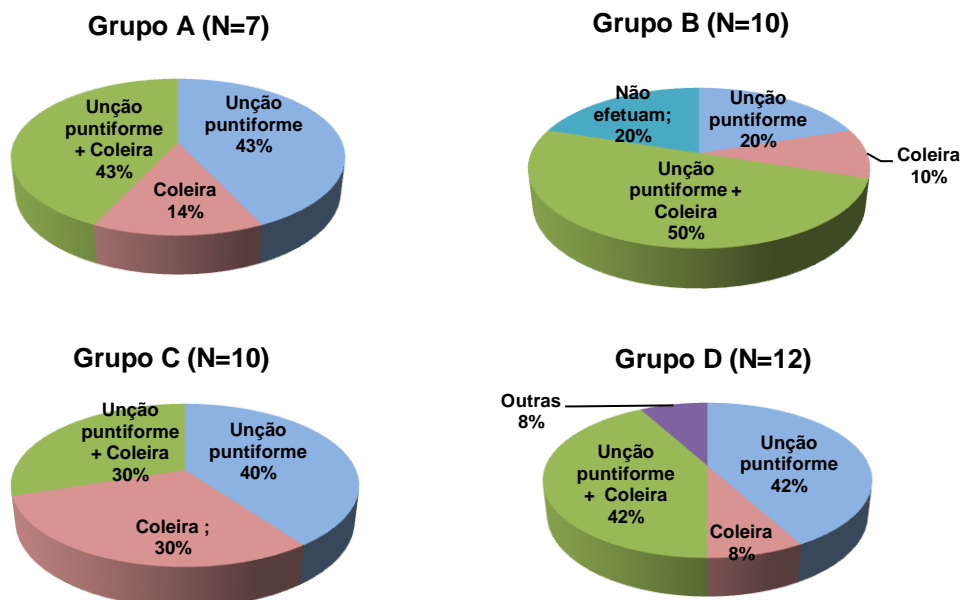
No Grupo A 14% (1/7) dos cães viajava com o seu proprietário e 86% (6/7) não viajava. Os animais que viajavam deslocavam-se para Álcacer do Sal nas épocas de Outono/Inverno. No Grupo B 50% (5/10) dos cães viajava com o seu proprietário e 50% (5/10) não viajava. Cada animal que viajava deslocava-se, respetivamente, para Coimbra na época de Verão (distrito de Leiria), para o Porto nas épocas de Inverno/Primavera (distrito do Porto), para a Sertã mensalmente (distrito de Castelo Branco), para Leiria semanalmente (distrito de Leiria) e para Portalegre mensalmente (distrito de Portalegre). No Grupo C 50% (5/10) dos cães viajava com o seu proprietário e 50% (5/10) não viajava. Cada animal que viajava deslocava-se, respetivamente, para a Lousã na época de Verão, por todo o país todo o ano,

para Nisa todo o ano (distrito de Portalegre), para Nisa em temporadas de 6 meses (distrito de Portalegre) e para as regiões de Évora e Faro durante o Verão. No Grupo D 67% (8/12) dos cães viajava com o seu proprietário e 33% (4/12) não viajava. Cada animal que viajava desloca-se, respetivamente, para Santarém ao fim de semana (distrito de Santarém), para a região do Algarve todo o ano, para Coimbra e C.Branco (distrito de Coimbra e C. Branco, respetivamente) durante o Verão, para Lisboa o ano inteiro, para C.Branco ao fim de semana, para Algarve e Ourém ao fim de semana e por último, novamente para Lisboa o ano inteiro.

b) Estrangeiro - Apenas um animal de deslocou para fora de Portugal. O cão B6 para a Suíça, uma vez e durante a época de Outono/Inverno.

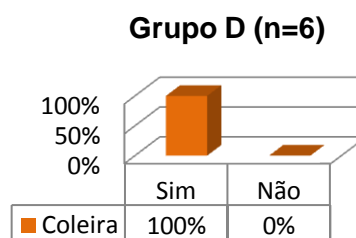
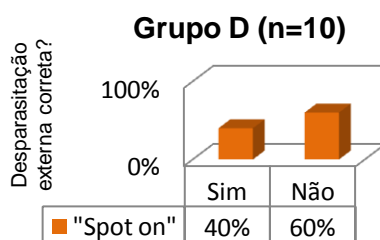
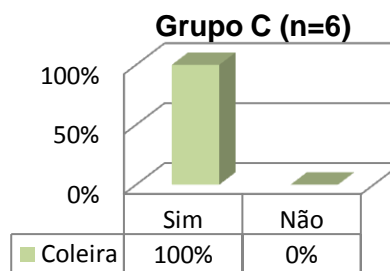
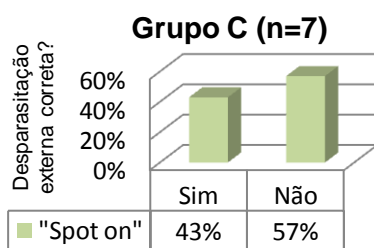
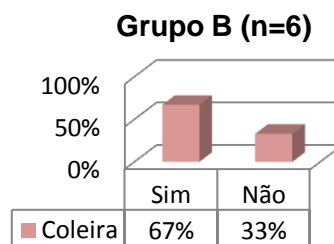
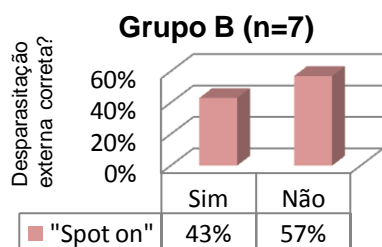
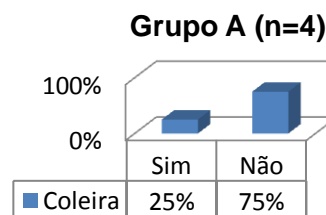
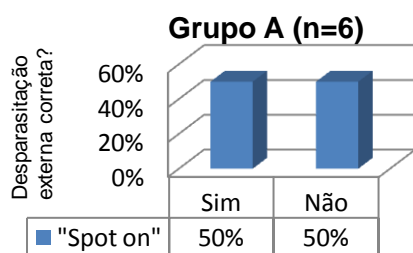
Controlo de ecto e endoparasitas: Os gráficos 47, 48, 49 e 50 ilustram a frequência relativa (%) da distribuição dos animais cujos proprietários efetuavam uma desparasitação externa com unção puntiforme (*spot on*), coleira ou associações e os gráficos 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57 e 58 ilustram a frequência relativa (%) da distribuição dos animais cujos proprietários efetuavam uma desparasitação externa corretamente.

Gráficos 47, 48, 49 e 50 - **Frequência relativa (%) da distribuição dos animais por grupos e tipos de desparasitação externa.**



Legenda: **A** - Cães com Leishmaniose e simultaneamente infectados com agentes de outras DCTV; **B** - Cães com afeções (excluindo Leishmaniose); **C** - Cães clinicamente saudáveis; **D** - Cães com Leishmaniose (com ou sem outras afeções); Unção puntiforme - Imidaclopride + Permetrina; Coleira - Deltametrina; Outras - Pulverizações com Fipronil.

Gráficos 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57 e 58 - Frequência relativa (%) da distribuição dos animais por grupos, relativamente a uma desparasitação externa administrada corretamente.



Legenda: **A** - Cães com Leishmaniose e simultaneamente infectados com agentes de outras DCTV; **B** - Cães com afeções (excluindo Leishmaniose); **C** - Cães clinicamente saudáveis; **D** - Cães com Leishmaniose (com ou sem outras afeções); "Spot on" - Imidaclopride + Permetrina; Coleira - Deltametrina.

Do Grupo A, 43% (3/7) dos proprietários desparasitavam os seus cães com unção puntiforme contendo Imidaclopride e Permetrina, 14% (1/7) com coleira contendo Deltametrina e os restantes 43% (3/7) com ambos os produtos. Dos cães que usavam unção puntiforme (n=6), 50% (3/6) eram corretamente desparasitados, aos restantes cães eram-lhes aplicadas de um modo irregular ou trimestralmente. Dos cães que usavam coleira (n=4), apenas 25% (1/4) eram corretamente desparasitados.

Do Grupo B, 20% (2/10) dos proprietários desparasitavam os seus cães com unção puntiforme contendo Imidaclopride e Permetrina, 10% (1/10) com coleira contendo Deltametrina, 50% (5/10) com ambos os produtos e os restantes 20% (2/10) não efetuavam

desparasitações. Dos cães que usavam unção puntiforme (n=7), 43% (3/7) eram corretamente desparasitados. Dos cães que usavam coleira (n=6), 67% (4/6) eram corretamente desparasitados.

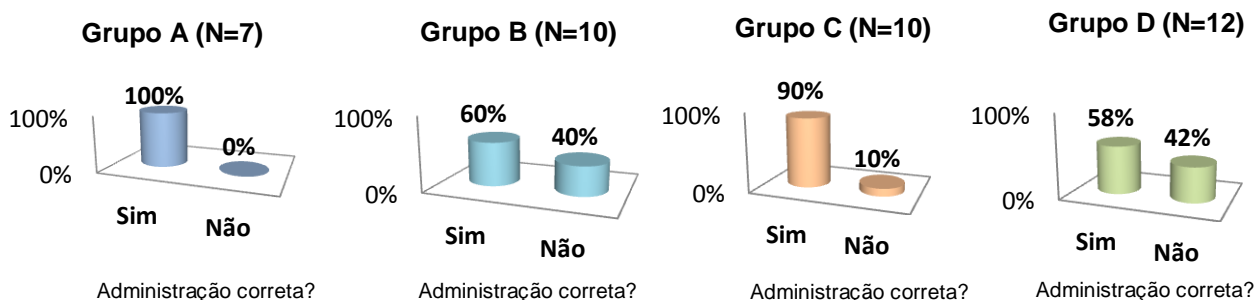
Do Grupo C, 40% (4/10) dos proprietários desparasitavam os seus cães com unção puntiforme contendo Imidaclopride e Permetrina, 14% (1/7) com coleira contendo Deltametrina e os restantes 43% (3/7) com ambos os produtos. Dos cães que usavam unção puntiforme (n=7), 43% (3/7) eram corretamente desparasitados e outros 57% (4/7) não o eram (aplicação irregular ou trimestral). Dos cães que usavam coleira (n=6), 100% (6/6) eram corretamente desparasitados.

Do Grupo D, 42% (5/12) dos proprietários desparasitavam os seus cães com unção puntiforme contendo Imidaclopride e Permetrina, 8% (1/12) com coleira contendo Deltametrina, 42% (5/12) dos proprietários aplicavam ambos os produtos e os restantes 8% (1/12) usavam pulverizações contendo Fipronil.

Dos cães que usavam unção puntiforme (n=10), apenas 40% (4/10) eram corretamente desparasitados. Dos cães que usavam coleira (n=6), 100% (6/6) eram corretamente desparasitados.

Relativamente à desparasitação interna, os gráficos 58, 59, 60 e 61 ilustram a distribuição dos animais relativamente ao modo (correto/incorrecto) como esta lhes era administrada.

Gráficos 59, 60, 61 e 62 - **Frequência relativa (%) da distribuição dos animais por grupos, quanto ao modo como os seus proprietários efetuam a desparasitação interna.**

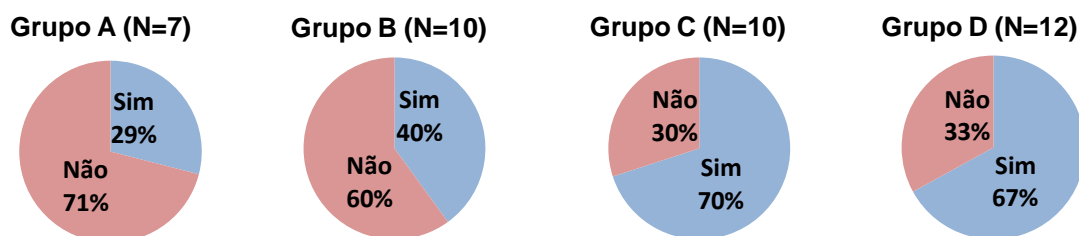


Legenda: **A** - Cães com Leishmaniose e simultaneamente infectados com agentes de outras DCTV; **B** - Cães com afeções (excluindo Leishmaniose); **C** - Cães clinicamente saudáveis; **D** - Cães com Leishmaniose (com ou sem outras afeções); Endoparasiticidas - Pasta ou comprimidos.

Relativamente à desparasitação interna, no Grupo A, 100% (7/7) dos cães eram corretamente desparasitados. No Grupo B, 60% (6/10) dos cães eram corretamente desparasitados. No Grupo C, 90% (9/10) eram corretamente desparasitados e no Grupo D, 58% (7/12) eram corretamente desparasitados.

Prevenção de Leishmaniose: Os gráficos 63, 64, 65 e 66 ilustram a distribuição (%) da opinião dos proprietários relativamente à realização da prevenção de Leishmaniose.

Gráficos 63, 64, 65 e 66 - **Frequência relativa (%) por grupos de animais, quanto à opinião dos proprietários acerca da realização ou não da prevenção contra Leishmaniose.**

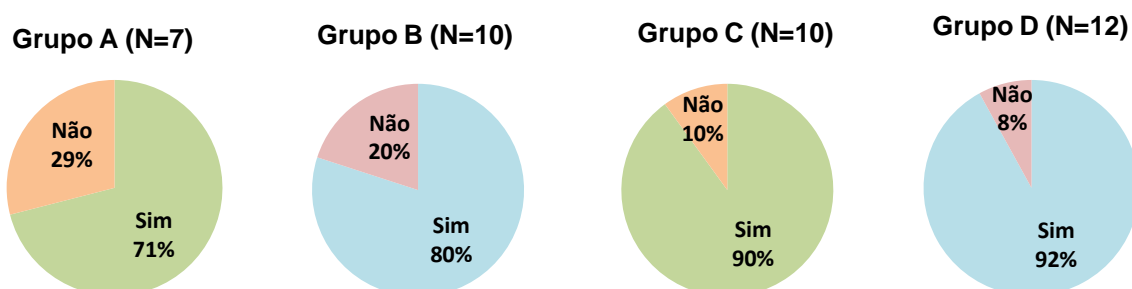


Legenda: **A** - Cães com Leishmaniose e simultaneamente infectados com agentes de outras DCTV; **B** - Cães com afeções (excluindo Leishmaniose); **C** - Cães clinicamente saudáveis; **D** - Cães com Leishmaniose (com ou sem outras afeções).

No Grupo A, 29% (2/7) dos proprietários dos cães consideraram fazer a prevenção de Leishmaniose, os restantes 71% (5/7) não consideraram. No Grupo B, 40% (4/10) consideraram fazer prevenção, 60% (6/10) não consideraram. No Grupo C, 70% (7/10) consideraram fazer prevenção, os restantes 30% (3/10) não consideraram. No Grupo D, 67% (8/12) dos proprietários consideraram fazê-la e 33% (4/12) não consideraram.

Conhecimento do proprietário acerca da infeção por *L. infantum*: Foi igualmente inquirido acerca do conhecimento da doença por parte dos proprietários dos animais, cujo resultado consta nos gráficos 67, 68, 69 e 70.

Gráficos 67, 68, 69 e 70 - **Frequência relativa (%) por grupos de animais, relativamente à familiaridade dos proprietários para com Leishmaniose.**



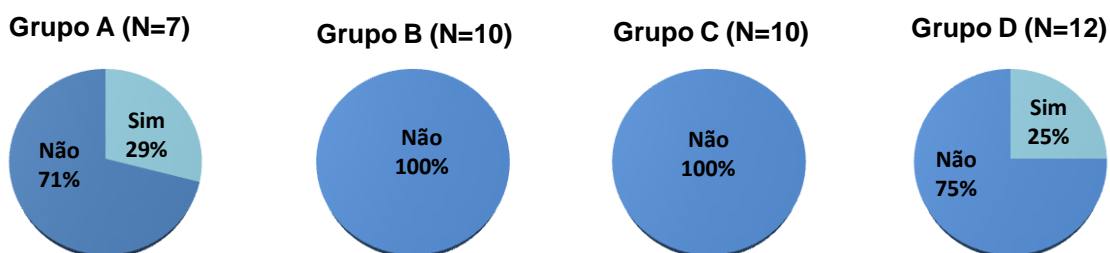
Legenda: **A** - Cães com Leishmaniose e simultaneamente infectados com agentes de outras DCTV; **B** - Cães com afeções (excluindo Leishmaniose); **C** - Cães clinicamente saudáveis; **D** - Cães com Leishmaniose (com ou sem outras afeções).

No Grupo A, 71% dos proprietários tinham conhecimentos acerca de leishmaniose e 29% já ouviram falar mas desconheciam como se transmite e processa a infeção. No Grupo B, 80%

(8/10) tinham conhecimentos e apenas 20% (2/10) desconheciam. No Grupo C, 90% (9/10) dos proprietários possuía informação e 10% desconhecia pormenores acerca da infeção por *L. infantum*. No Grupo D, 92% (11/12) conheciam este tema e apenas 8% o desconhecia.

Insuficiência Renal Crónica: As análises laboratoriais e sinais clínicos dos animais permitiram detetar a presença ou ausência de IRC (Gráficos 70, 71, 72 e 73).

Gráficos 70, 71, 72 e 73 - **Frequência relativa (%) dos animais com IRC.**



Legenda: **A** - Cães com Leishmaniose e simultaneamente infectados com agentes de outras DCTV; **B** - Cães com afeções (excluindo Leishmaniose); **C** - Cães clinicamente saudáveis; **D** - Cães com Leishmaniose (com ou sem outras afeções).

No grupo A, 29% (2/7) já apresentavam algum grau de IRC. Nos Grupos B e C todos os animais estavam livres de IRC. No Grupo D, 25% (3/12) possuíam IRC.

Sinais clínicos, alterações laboratoriais e infeções/doenças concomitantes: Os sinais clínicos compatíveis com Leishmaniose e outras infeções ou doenças concomitantes apresentadas pelos cães dos grupos A e D, estão expressas no Anexo III, assim como os sinais clínicos, alterações laboratoriais e infeções/doenças presentes nos cães do grupo B.

Não foram realizadas análises hematológicas e bioquímicas, proteinograma e urianálise a todos os animais do Grupo B. Nos Grupos A e D, também não foi realizado um proteinograma ou urianálise a alguns animais.

Relativamente aos sinais clínicos, no Grupo A verificou-se que 57% (4/7) dos cães apresentavam linfadenomegália generalizada ou local, 29% (2/7) caquexia ou perda de peso, 14% (1/7) onicogrifose, 29% (2/7) lesões cutâneas, 29% (2/7) epistaxis uni ou bilateral, 29% (2/7) esplenomegália, 14% (1/7) artrite, 14% (1/7) alterações oculares, 57% (4/7) palidez das mucosas e 43% (3/7) apresentavam edemas.

No Grupo D verificou-se que 25% (3/12) dos cães apresentavam linfadenomegália generalizada ou local, 50% (6/12) caquexia ou perda de peso, 11% (1/12) onicogrifose, 25% (3/12) apresentavam uma má condição da pelagem, 75% (9/12) lesões cutâneas, 25% (3/12) epistaxis uni ou bilateral, 17% (2/12) artroses ou artrite, 8,3% (1/12) alterações oculares, 8,3% (1/12) palidez das mucosas e 8,3% (1/12) apresentavam hipertermia.

No Grupo B verificou-se que todos os cães com sinais clínicos compatíveis com LCan (30%, 3/10, apresentavam prostração, alopecia, linfadenomegalia ou hipertermia), tinham outras DCTV que não a leishmaniose.

Relativamente às alterações verificadas no hemograma, análises bioquímicas (bq), proteinograma e urianálise: No Grupo A, 86% (6/7) tinham anemia, 14% (1/7) trombocitose, 14% (1/7) trombocitopenia, 43% (3/7) leucocitose, 29% (2/7) neutrofilia, 29% (2/7) hipoalbuminemia, 14% (1/7) aumento das PTs, 14% (1/7) aumento da FAS, 57% (4/7) aumento da ureia e/ou creatinina, 75% (3/4) proteinúria, 50% (2/4) hematúria e 100% (2/2) hiperalfa/gama/betaglobulinemia.

No Grupo D, 33,3% (4/12) tinham anemia, 8,3% (1/12) trombocitose, 8,3% (1/12) trombocitopenia, 25% (3/12) leucocitose ou linfocitose, 17% (2/12) neutrofilia, 17% (2/12) linfopenia ou leucopenia, 8,3% (1/12) hipoalbuminemia, 17% (2/12) aumento das PTs, 17% (2/12) aumento da ureia e/ou creatinina, 33,3% (1/3) proteinúria, 33,3% (1/3) hematúria, 33,3% (1/3) apresentavam bilirubinemia e bilirubinúria, e 100% (7/7) hiperalfa/gama/betaglobulinemia.

O grupo C, grupo controlo, não apresentava qualquer sinal clínico digno de registo.

3.2. Resultados obtidos na pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* pela técnica de IFI

A população em estudo foi testada pela técnica de IFI, na diluição 1:80 (Tabela 10). Resumindo os resultados para cada grupo, a pesquisa de anticorpos foi positiva para todos os animais do Grupo A; foi negativa para todos os animais do Grupo B; foi negativa para todos os animais do Grupo C, e no Grupo D existem três tipos de resultados (Negativo, Duvidoso e Positivo), existindo 7 resultados positivos (cães D5,6,7,8), 4 resultados negativos (cães D1,2,9,10) e um resultado duvidoso (cão D3).

Nas Figuras 19 e 20 estão ilustrados um controlo positivo e um negativo.

Figura 19 – Aspeto de um controlo positivo para *Leishmania* spp. (original).

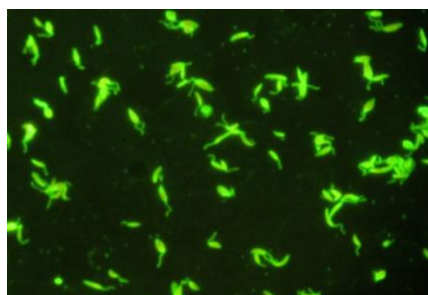


Figura 20 – Aspeto de um controlo negativo para *Leishmania* spp. (original).

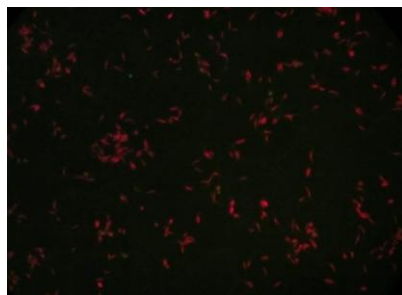


Tabela 10 – Resultados obtidos pela técnica de IFI.

Resultado IFI (1:80)			
A	B	C	D
1 - Positivo	1 - Negativo	1 - Negativo	1 - Negativo
2 - Positivo	2 - Negativo	2 - Negativo	2 - Negativo
3 - Positivo	3 - Negativo	3 - Negativo	3 - Duvidoso
4 - Positivo	4 - Negativo	4 - Negativo	4 - Positivo
5 - Positivo	5 - Negativo	5 - Negativo	5 - Positivo
6 - Positivo	6 - Negativo	6 - Negativo	6 - Positivo
7 - Positivo	7 - Negativo	7 - Negativo	7 - Positivo
	8 - Negativo	8 - Negativo	8 - Positivo
	9 - Negativo	9 - Negativo	9 - Negativo
	10 - Negativo	10 - Negativo	10 - Negativo
			11 - Positivo
			12 - Positivo

3.3. Resultados obtidos na pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* pela técnica de ELISA

De um modo resumido, todos os animais do Grupo A tiveram um resultado positivo; todos os animais do Grupo B tiveram um resultado negativo; todos os animais do Grupo C tiveram um resultado negativo e no Grupo D, a maioria dos animais apresentou um resultado positivo à exceção dos cães D2 e D9 (Tabela 11).

Tabela 11 – Resultados obtidos pela técnica de ELISA.

Resultado ELISA (Rz)			
A	B	C	D
1 - Positivo (3.96)	1 - Negativo	1 - Negativo	1 - Positivo (1.7)
2 - Positivo (3.1)	2 - Negativo	2 - Negativo	2 - Negativo
3 - Positivo (3.3)	3 - Negativo	3 - Negativo	3 - Positivo (2.9)
4 - Positivo (2.6)	4 - Negativo	4 - Negativo	4 - Positivo (1.7)
5 - Positivo (7.6)	5 - Negativo	5 - Negativo	5 - Positivo (3.6)
6 - Positivo (5.1)	6 - Negativo	6 - Negativo	6 - Positivo (2.9)
7 - Positivo (7.0)	7 - Negativo	7 - Negativo	7 - Positivo (4.0)
	8 - Negativo	8 - Negativo	8 - Positivo (3.8)
	9 - Negativo	9 - Negativo	9 - Negativo
	10 - Negativo	10 - Negativo	10 - Positivo (1.9)
			11 - Positivo (1.8)
			12 - Positivo (5.2)

3.4. Resultados obtidos na pesquisa de DNA de *Leishmania infantum* pela técnica de qPCR

Todos os cães do Grupo A tiveram um resultado positivo excepto o cão A6; todos os cães do Grupo B tiveram um resultado negativo, excepto os cães B5 e B9; todos os cães do Grupo C tiveram um resultado negativo excepto o cão C10; e no Grupo D, os cães D2,5,6,8 e 11, tiveram um resultado positivo e os os cães D1,3,4,7,9,10 e 12, um resultado negativo (Tabela 12).

Tabela 12 – Resultados obtidos pela técnica de qPCR.

Resultado qPCR (Valor C _T)			
A	B	C	D
1 - Positivo (32,61)	1 - Negativo	1 - Negativo	1 - Negativo
2 -Positivo (37,33)	2 - Negativo	2 - Negativo	2 - Positivo (40,52)
3 - Positivo (24,99)	3 - Negativo	3 - Negativo	3 - Negativo
4 - Positivo (38,52)	4 - Negativo	4 - Negativo	4 - Negativo
5 - Positivo (36,56)	5 - Positivo (39,15)	5 - Negativo	5 - Positivo (32,12)
6 - Negativo	6 - Negativo	6 - Negativo	6 -Positivo (34,68)
7 - Positivo (25,43)	7 - Negativo	7 - Negativo	7 - Negativo
	8 - Negativo	8 - Negativo	8 - Positivo (28,25)
	9 - Positivo (39,6)	9 - Negativo	9 - Negativo
	10 - Negativo	10 - Positivo (36,69)	10 - Negativo
			11 - Positivo (23,38)
			12 - Negativo

Os valores médios de Ct obtidos para cada diluição, são representados graficamente em função do logaritmo do número estimado de cópias da região genómica presente nas reações, obtendo-se uma regressão linear dos pontos assim como o seu coeficiente de correlação (Gráfico 74). A reta padrão foi então obtida representando a concentração de DNA alvo das diluições seriadas em relação aos respetivos números de ciclo (C_T) em que se detetou produção de fluorescência acima da linha de limite nessas diluições.

A seguinte expressão foi usada para traduzir o valor deste concentração de DNA, em número de cópias por microlitro (Dhanasekaran, Doherty & Kenneth, 2010).

$$N^{\circ} \text{ de cópias}/\mu\text{L} = \frac{[\text{DNA}](\text{g}/\mu\text{L}) \times 6,022 \times 10^{23} (\text{moléculas}/\text{mole})}{[\text{Comprimento do fragmento}] \times 660 \text{ daltons}}$$

O número de cópias/ μL correspondente a cada valor de C_T obtido para cada amostra, equivalente à carga parasitária, que variou aproximadamente entre 50 e 350, foi de seguida estimado utilizando a equação da reta padrão ($y = -3,3285x + 42,817$) (Tabela 13).

Tabela 13 – Resultados da carga parasitária (cópias/μL) dos quatro grupos de cães testados pela técnica de qPCR.

	qPCR - C _T / Carga Parasitária (cópias/μL)			
	A	B	C	D
1	32,6 / 180	Neg.	Neg.	Neg.
2	37,3 / 99	Neg.	Neg.	40,5 / 41.45
3	25 / 322	Neg.	Neg.	Neg.
4	38,5 / 78	Neg.	Neg.	Neg.
5	36,6 / 113	39,2 / 66	Neg.	32,1 / 193
6	Neg.	Neg.	Neg.	34,7 / 147
7	25,4 / 314	Neg.	Neg.	Neg.
8	---	Neg.	Neg.	28,3 / 263
9	---	39,6 / 58	Neg.	Neg.
10	---	Neg.	36,7 / 110	Neg.
11	---	---	---	23,4 / 350
12	---	---	---	Neg.

Legenda: Neg. - Negativo

3.5. Resultados da análise estatística efetuada

Como já foi referido a amplamente estudado, a técnica de IFI permanece o teste de referência (*gold standard*) para o diagnóstico da infeção por *Leishmania*. Face a este fato, analisou-se se os resultados da técnica de ELISA seriam independentes dos da técnica anterior, através do Teste Exato de Fischer, para cada grupo e para a população total (Tabela 14).

Visto que a técnica de diagnóstico qPCR é uma técnica molecular, não se pôde realizar uma análise estatística com base na comparação desta com a técnica de IFI, técnica serológica.

Tabela 14 – Resultados do Teste de Fischer aplicado às duas técnicas de diagnóstico, por grupos, testando a hipótese nula (H0 – IFI vs. ELISA são independentes).

	Teste Fischer	
	IFI / ELISA (valor de <i>p</i>)	Significativo?
Grupo A	NA	NA
Grupo B	NA	NA
Grupo C	NA	NA
Grupo D	0,15	Não
População (n=39)	$2,2 \times 10^{-16}$	Sim

Legenda: A - Cães com Leishmaniose e simultaneamente infectados com agentes de outras DCTV; B - Cães com afeções (excluindo Leishmaniose); C - Cães clinicamente saudáveis; D - Cães com Leishmaniose (com ou sem outras afeções); NA - Não avalável.

Para os Grupos A, B e C, o Teste Exato de Fischer não gerou resultados ou não foi possível de realizar, pois só existiu um tipo de resultados, positivos ou negativos, para estes grupos. Para o Grupo D não se verifica a existência de associação estatística entre as duas

técnicas, visto que o valor de significância (p) é maior que 0,05. No entanto para a população deste estudo ($n=39$), visto o valor de p ser inferior a 0,05, rejeita-se a hipótese nula que diz que “ H_0 - IFI vs. ELISA são independentes” e pode afirmar-se com 95% de confiança que as duas técnicas não são independentes entre si e que ao usar qualquer um dos dois testes o resultado obtido é semelhante.

Este estudo irá apenas focar-se nos resultados obtidos por grupo e não na população.

De referir que a amostra é pouco representativa, logo as extrapolações para a população em geral devem ser feitas com bastantes reservas.

Relativamente à Sensibilidade (probabilidade de os animais doentes apresentarem um resultado positivo no teste de diagnóstico) e Especificidade (probabilidade de os animais não doentes apresentarem um resultado negativo no teste de diagnóstico) das duas técnicas serológicas, estas foram analisadas na técnica de ELISA, face à técnica de IFI, para cada grupo (Tabela 15).

Tabela 15 – Resultados da aplicação da ferramenta EpiTools (AusVet Animal Health Services®) à técnica de IFI e ELISA, por grupos.

Grupo	Intervalo de Confiança de 95% - ELISA	
	Sensibilidade	Especificidade
A	100% (59 a 100%)	NA
B	NA	100% (69 a 100%)
C	NA	100% (69 a 100%)
D	78% (40 a 97%)	100% (16 a 100%)

Legenda: **A** - Cães com Leishmaniose e simultaneamente infectados com agentes de outras DCTV; **B** - Cães com doenças (excluindo Leishmaniose); **C** - Cães clinicamente saudáveis; **D** - Cães com Leishmaniose (e outras doenças); **NA** - Não avaliável.

Quando calculável, pois existem grupos apenas com um tipo de resultado (“Positivo” ou “Negativo”), com uma confiança de 95% e tendo como referência os resultados obtidos por IFI, diz-se que a técnica de ELISA apresenta 100% de Sensibilidade para o Grupo A e 100% de Especificidade nos Grupos B e C. Para o grupo D e com o mesmo grau de confiança, apresenta uma sensibilidade de 78% e uma especificidade de 100%.

As variáveis ou fatores de risco sujeitas a análise estatística usando o Teste Exato de Fischer, foram a raça, o sexo, o ser ou não castrado (estado), a idade, a pelagem, o porte, a proveniência, o local de habitação, concelho de residência, número de passeios diários, cohabitação com outros animais, viagens por Portugal (distrito e época do ano), controlo de ecto e endoparasitas, presença de outros hemoparasitas e outras doenças concomitantes. A avaliação da possibilidade de associação estatística entre estes fatores e a positividade a *Leishmania* foi avaliada para cada grupo. Os resultados estão expressos na Tabela 16.

Tabela 16 – Resultados do Teste de Fischer, relacionando diversos fatores de risco para a infecção por *Leishmania* com os resultados obtidos pelas três técnicas de diagnóstico, em cada grupo.

	Grupo A		Grupo B		Grupo C		Grupo D	
	IFI/ ELISA	qPCR	IFI/ ELISA	qPCR	IFI/ ELISA	qPCR	IFI / ELISA	qPCR
Raça	NA	1	NA	0,16	NA	0,6	0,06 / 0,77	1
Sexo	NA	1	NA	0,44	NA	1	0,72 / 0,09	1
Ser ou não castrado (estado)	NA	NA	NA	0,38	NA	1	0,26 / 1	1
Idade	NA	0,43	NA	0,8	NA	1	1 / 1	0,75
Pelagem	NA	1	NA	1	NA	1	0,55 / 1	1
Porte	NA	0,14	NA	0,09	NA	0,6	0,62 / 0,46	1
Proveniência	NA	0,57	NA	0,73	NA	0,2	0,55 / 0,32	0,42
Local de Habitação	NA	1	NA	1	NA	0,2	0,07 / 1	0,09
Concelho de Residência	NA	0,71	NA	0,4	NA	1	0,85 / 0,11	1
Nº Passeios diários	NA	1	NA	1	NA	1	0,06 / 1	0,74
Convive com outros cães?	NA	1	NA	0,13	NA	1	0,27 / 1	0,21
Convive com outros animais?	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Viaja por Portugal?	NA	0,14	NA	0,44	NA	1	1 / 1	0,22
Distrito	NA	NA	NA	1	NA	0,6	0,1 / 0,5	0,29
Época do ano	NA	NA	NA	1	NA	1	0,57 / 1	0.04
Controlo Ectoparasitas?	NA	0,43	NA	1	NA	1	0,62 / 0,46	1
Controlo de Endoparasitas?	NA	0,43	NA	1	NA	1	0,29 / 1	0,68
Outros Hemoparasitas?	NA	NA	NA	1	NA	NA	NA	NA
Doenças Concomitantes?	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,74 / 1	1

Legenda: NA - Não avaliablel

Sempre que não foi possível realizar estes cálculos, colocou-se o símbolo (NA). Dos vários fatores de risco avaliados, no grupo D, a época do ano em que o animal viajou por Portugal apresentou um resultado estatisticamente significativo relativamente à técnica de qPCR, com um valor de p inferior a 0,05 ($p=0,04$). Neste fator houve uma tentativa de perceber o porque do resultado estatístico obtido, analisando a época em que cada animal viajava pelo país (Tabela 17). Todas as outras variáveis analisadas para as técnicas de IFI, ELISA e qPCR, não obtiveram resultados com significado estatístico ($p > 0,05$), apesar do nº de passeios diários no grupo D e na técnica de IFI de aproximar bastante de um valor de p estatisticamente significativo. Nos grupos A, B e C, não se obteve nenhuma associação estatística.

Tabela 17 – Distribuição dos animais do Grupo D que viajam pelo país, pela época do ano em que o efetuam.

Grupo D (n=8)	Época do ano
D1 (Santarém)	Prim./Ver./Out./Inv.
D3 (Faro)	Prim./Ver./Out./Inv.
D5 (Coimbra, C. Branco)	Verão
D6 (Coimbra, C. Branco)	Verão
D7 (Lisboa)	Prim./Ver./Out./Inv.
D9 (C. Branco)	Prim./Ver./Out./Inv.
D10 (Ourém, Faro)	Prim./Ver./Out./Inv.
D12 (Lisboa)	Prim./Ver./Out./Inv.

No grupo D verifica-se que o número de animais que viajam o ano inteiro, ou seja nas 4 estações do ano, prevalece sobre os que viajam apenas no verão.

Partindo do pressuposto que a técnica de IFI é o *gold standard* para o diagnóstico de Leishmaniose, analisou-se também a influência dos vários fatores nos resultados falsos positivos (FP) resultantes da técnica de ELISA, aplicando o Teste Exato de Fischer a todos os fatores de risco e à variável “Avaliação da Especificidade de ELISA” (Tabela 18). Não se pôde efetuar a análise com o parâmetro “Avaliação da Sensibilidade de ELISA”.

Tabela 18 – Resultados da aplicação do Teste de Fischer aos quatro grupos, relacionando os vários fatores de risco com a “Avaliação da Especificidade de ELISA”.

	Av. Especif. ELISA (valor de <i>p</i>)	
Fatores de Risco	Grupos A/B/C	Grupo D
Raça	NA	0,42
Sexo	NA	1
Ser ou não castrado (estado)	NA	1
Idade	NA	0,67
Pelagem	NA	0,44
Porte	NA	0,42
Proveniência	NA	1
Local de Habitação	NA	0,17
Concelho de Residência	NA	1
Nº Passeios Diários	NA	0,08
Convive com outros cães?	NA	0,42
Convive com outros animais?	NA	NA
Viaja por Portugal?	NA	0,5
Distrito	NA	0,2
Época do ano	NA	0,47
Controlo Ectoparasitas?	NA	0,42
Controlo de Endoparasitas?	NA	0,42
Outros Hemoparasitas?	NA	NA
Doenças concomitantes?	NA	0,44

Legenda: NA - Não avaliável

Dado que, os resultados desta técnica foram todos coincidentes com os da técnica de IFI, nos grupos A, B e C, não se pôde efetuar esta análise. Relativamente ao grupo D, não se verificou a existência de associação estatística entre a Especificidade da técnica de ELISA e os vários fatores de risco.

4. Discussão

É comum o procedimento de pesquisa de Ac ou de DNA de *Leishmania* em cães saudáveis ou doentes (seja qual for a doença) que vivam em zona endémica como é o caso de Portugal e da Bacia Mediterrânica.

O HEFMV tem uma vasta casuística no que diz respeito à clínica de animais de companhia, recebendo animais de toda a Área Metropolitana de Lisboa e mesmo pacientes referenciados de outras partes do País. Assim, reuniu boas condições para a realização deste estudo. Foram sentidas algumas limitações, sendo de salientar o não se ter conseguido criar um grupo só com DCTV e consequentemente determinar a presença/ausência de reações cruzadas entre alguns agentes e *Leishmania*. Foi também sentida alguma falta de disponibilidade e aceitação por parte dos proprietários dos animais na colheita das amostras biológicas, dificultando a obtenção de amostras. Este estudo decorreu apenas durante 6 meses, na época de Out./Inv., havendo a possibilidade de diversos animais terem contactado com o vetor nos meses de maior calor, terem-se apresentado à consulta e estarem infetados mas assintomáticos. Visto o horário de estágio ser rotativo, nem sempre a autora pôde acompanhar todas as consultas de medicina interna e efetuar os procedimentos aos animais pretendidos para inclusão no estudo. Dada a existência de uma verba limitada para realizar as diferentes técnicas mencionadas neste trabalho, apenas se estipulou inicialmente uma população de 40 animais (com idade superior a um ano, a partir da qual já deverão ser imunocompetentes) e se reuniram 39, distribuídos por quatro grupos (A, B, C e D).

Dos 39 cães que pertenceram a este estudo, 7 animais enquadraram-se no Grupo A - Cães com Leishmaniose e simultaneamente infectados com agentes de outras DCTV; 10 animais no Grupo B - Cães doentes com outras afeções - Doenças dermatológicas, Alterações oculares, Infecções Bacterianas, Tumores, Doenças endócrinas e DCTV (Babesiose, Erlichiose, Rickettsiose, excluindo Leishmaniose); 10 animais no Grupo C - Cães clinicamente saudáveis; e 12 animais no Grupo D - Cães com Leishmaniose (e outras doenças).

A discussão incidirá nos quatro grupos formados, relativamente aos sinais clínicos e laboratoriais, resultados obtidos pelas técnicas de diagnóstico serológico (IFI e ELISA) e molecular (qPCR) e dados obtidos no inquérito realizado aos proprietários dos cães, ou seja, os fatores de risco para a positividade a *L. infantum*.

Sinais clínicos, alterações laboratoriais e doenças concomitantes:

No grupo A, relativamente aos sinais clínicos e alterações laboratoriais presentes em cães com Leishmaniose e outras DCTV, verificou-se que no geral, os dados obtidos neste estudo estão em concordância com os descritos na literatura por diversos autores (Slappendel, 1988; Ciaramella *et al.*, 1997; Peña, Roura & Davidson, 2000; Solano-Gallego, Morell, Arboix & Alberola, 2001; Shaw *et al.*, 2009; Armés, 2010; Petersen & Barr, 2010; Solano-Gallego *et al.*, 2011; Trópia de Abreu *et al.*, 2011; Baneth & Solano-Gallego, 2012; Roze, 2013; Veras, Fraga, Solcà & Guedes; Vieira, 2014).

O mesmo se observou no grupo D, tendo alguns sinais clínicos e resultados laboratoriais maior relevância do que outros, como também é usual nesta infeção.

É importante ter em conta que nem todos os animais realizaram análises hematológicas, bioquímicas, proteinograma e urianálise, ou por razões sócio-económicas por parte do proprietário, ou por o médico-veterinário que assistiu o animal não achar pertinente naquela altura. Logo, estes resultados poderiam na realidade ter uma maior expressão.

No Grupo B verificou-se que todos os cães com sinais clínicos compatíveis com LCan (30% - 3/10, apresentavam prostração, alopecia, linfadenomegália ou hipertermia), tinham outras DCTV que não a leishmaniose.

O grupo C, como grupo controlo, englobou apenas cães clinicamente saudáveis.

De acordo com a bibliografia, os cães sintomáticos têm cerca de três vezes maior probabilidade de serem seropositivos em relação aos assintomáticos (Mesquita de Figueiredo *et al.*, 2014).

Assume-se que a maioria dos cães em áreas altamente endémicas, onde a transmissão de *Leishmania* spp. se dá ativamente, está exposta à infeção. De fato demonstra-se que uma fração da população desenvolve sintomatologia, outra tem uma infeção assintomática persistente e outra é resistente à infeção ou demonstra uma infeção intermitente que se resolve sem se desenvolverem sinais clínicos (Baneth & Aroch, 2008). A leishmaniose é de facto, um bom exemplo de uma doença em que infeção não é sinónimo de doença clínica (Baneth & Aroch, 2008; Baneth & Solano-Gallego, 2012).

Sendo a IRC a principal e mais dramática complicação da LCan, justificava-se a medição dos valores de BUN e creatinina em todos os cães infetados (grupos A e D), mas tal não foi possível. A proteinúria habitualmente é um achado comum, devido a nefropatias com perda de proteína, como glomerulonefrite com deposição de imunocomplexos, indicativa de presença de doença renal (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Petersen, 2010). Nos grupos A e D, alguns animais já tinham IRC em diferentes estádios; outros apresentavam algum sinal de lesão renal (azotémia, proteinúria, hematúria).

Avaliação dos resultados obtidos nas técnicas de IFI e ELISA - Diagnóstico Serológico:

Para o diagnóstico da infeção por *Leishmania infantum* em cães, usaram-se amostras de soro na realização das técnicas serológicas de IFI (rastreo na diluição 1:80) e ELISA. Estes

métodos serológicos visam detetar Ac circulantes produzidos face a esta infeção e podem ser empregues em várias amostras biológicas (plasma, soro, sangue).

Relativamente aos resultados obtidos nas técnicas de IFI e ELISA: no grupo A, 100% (7/7) dos cães obtiveram um resultado positivo em ambas as técnicas; no grupo B, 100% (10/10) dos cães obtiveram um resultado negativo em ambas; no grupo C, 100% (10/10) obtiveram um resultado negativo em ambas; no grupo D, na técnica de IFI, 58% (7/12) dos cães obtiveram um resultado positivo, 33% (4/12) um resultado negativo e 8% (1/12) um resultado duvidoso. Neste mesmo grupo e pela técnica de ELISA, 83% (10/12) dos cães obtiveram um resultado positivo e 17% (2/12) um resultado negativo.

Verificou-se então que, os resultados dos grupos A, B, e C, relativamente às duas técnicas, foram todos coincidentes, o mesmo não acontecendo com o grupo D.

No grupo A todos os animais se encontravam infetados por *L.infantum* e outras DCTV (*R. conorii*, *B. canis* e *E. canis*).

Títulos altos de anticorpos estão associados a uma grande carga parasitária presente nos tecidos do animal e à presença de doença (Reis *et al.*, 2006; Manna, Reale, Vitale, & Gravino, 2009). Os anticorpos anti-*Leishmania* são habitualmente detectados em cães infetados e com sinais clínicos. Portanto, um título alto suporta o diagnóstico e é conclusivo em cães com sinais clínicos compatíveis ou alterações clinicopatológicas (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Em casos de baixa titulação de anticorpos (por ex., titulações inferiores a 1:80 na IFI) e sinais clínicos compatíveis, deve-se adicionar outros métodos de diagnóstico para excluir ou confirmar a doença, pois pode significar que o animal tenha uma infeção subclínica (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Numa infeção natural por *L. infantum*, a seroconversão pode ocorrer meses após a infeção, variando de 1 a 22 meses, mas habitualmente em média 5 meses (Paltrinieri *et al.*, 2010).

Os resultados presentes neste estudo, visto a técnica de IFI ser o *gold standard* (Alvar *et al.*, 2004; Maia & Campino, 2008; Baneth & Solano-Gallego, 2012), estão de acordo com os sinais clínicos presentes nos cães do grupo A.

No grupo A, confirma-se então a presença de Ac anti-*Leishmania* através de duas serologias com resultado positivo. Estes animais contataram com o vetor, instalou-se uma infeção e houve uma resposta imunitária do tipo humoral, marcada, com produção de Ac e sem efeito protetor contra a doença devido à presença dos sinais clínicos (Reis *et al.*, 2006). O curso da infeção depende da eficácia da resposta de cada animal. Os animais com sinais clínicos típicos e resultado positivo, têm então LCan, já nos animais com títulos de Ac mais baixos não indica necessariamente doença levando a uma maior investigação (Campino, 2002; Solano-Gallego *et al.*, 2011a), usando outros métodos de diagnóstico como citologias, histopatologia e PCR (Miró *et al.*, 2008).

Nos animais com títulos baixos, ao existirem sinais clínicos também comuns a outras doenças, este resultado pode significar uma reação cruzada pela infeção por outros agentes

(outras espécies de *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Babesia*, *Ehrlichia*) (Gomes *et al.*, 2008; Paltrinieri *et al.*, 2010), ou poderá tratar-se de uma infecção recente e o animal ainda estar em seroconversão ou ainda, torna-se sintomático após a infecção, tendo uma cura clínica espontânea ou evolução para infecção crónica (Pereira, 2008). Em cães já se verificaram coinfeções por *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Bartonella*, *Babesia*, *Hepatozoon*, *Leishmania* e *Rickettsia*, em áreas endémicas (Shaw *et al.*, 2001).

Os géneros *Babesia* e *Ehrlichia/Rickettsia*, comuns em cães, já foram reportadas nalguns estudos como agentes que fazem reações cruzadas com espécies de *Leishmania* (Gomes & Cordeiro, 2004; Olivia *et al.*, 2008; Baneth & Solano-Gallego, 2012). Já Oliveira *et al.* (2008) examinaram soros de cães habitantes de áreas endémicas e não endémicas e descobriram apenas uma coinfeção em vez de reações cruzadas entre Ac anti-*Leishmania* e anti-*B.canis* ou anti-*E.canis* (Paulan *et al.*, 2013).

É necessário existirem valores altos de sensibilidade e especificidade para evitar resultados falsos negativos, os quais vão subestimar a taxa de infecção nas populações caninas em áreas endémicas, assim como resultados falsos positivos, que podem conduzir a eutanásias desnecessárias de cães que não estejam de facto infetados (Maia & Campino, 2008).

Embora as coinfeções possam ser transmitidas em simultâneo normalmente há uma precedente. A presença de uma infecção pode facilitar a disseminação de uma já latente, ou por outro lado permitir o estabelecimento de uma nova (Baneth, 2009, citado por Silva, 2009). Diferentes infecções podem apresentar sinais clínicos semelhantes e a maior parte das vezes, inespecíficos, como já se referiu.

Na maioria dos casos a LCan é uma doença arrastada, subaguda a crónica, com uma progressão da sintomatologia ao longo de meses com um longo período de incubação, que varia entre 3 meses a 6 ou 7 anos (Baneth & Solano-Gallego, 2012; Roze, 2013).

No grupo B, 3 animais possuíam outras DCTV, em particular, o cão B3 tinha uma infecção por *Ehrlichia canis* (1/50) e *Rickettsia conorii* (1/80), e os cães B7 e B9 uma infecção por *Rickettsia conorii* (1/40). 3 animais possuíam infeções bacterianas (otite bilateral, colite, gastroenterite, ITU), 3 animais tinham uma doença imunomediada (atopia), um animal era doente oncológico (lipoma, epitelioma) e outro apresentava doenças endócrinas (síndrome de Cushing, Diabetes mellitus) e alterações oculares (úlceras da córnea) e outro apresentava demodectose generalizada. Neste grupo verificou-se que todos os cães com DCTV tinham sinais clínicos compatíveis com LCan, como prostração, alopecias, linfadenomegália e hipertermia. Neste grupo todos os cães obtiveram um resultado negativo em ambas as técnicas não se verificando nenhuma influência das doenças presentes neste cães no resultado laboratorial, ou seja a existência de resultados FP. O fato de os cães B7 e B9, com DCTV, não apresentarem um resultado positivo e consequentemente ausência de reações cruzadas, não o torna conclusivo devido à amostra ser muito pequena para se retirarem conclusões fidedignas.

Um resultado negativo em serologia, como irá ser referido mais adiante, poderá significar a ausência de contato com o parasita ou então uma infecção/contato recente ou tardia, sem produção de Ac.

No grupo D, todos os animais apresentavam pelo menos um sinal clínico. Como existiram resultados discordantes entre as duas técnicas serológicas cada cão irá ser analisado individualmente.

O cão D1, macho de 13 anos, em regime misto, incorretamente desparasitado, com sinais clínicos e laboratoriais típicos e com doenças concomitantes (epilepsia e neoplasia das glândulas hepatóides), poderia ter uma infecção antiga estar imunodeprimido e já não ser capaz de produzir Ac em quantidade suficiente para serem detetados pela técnica de IFI, no entanto sendo detetados por ELISA, ou tratar-se de uma infecção recente estando o animal ainda em seroconversão e o resultado positivo tratar-se de um FP. Uma resolução espontânea da infecção parece pouco provável num cão já idoso e doente.

O cão D2, fêmea de 10 anos, antigo cão errante, de exterior, não desparasitada, apresentou um resultado negativo em ambas as técnicas. Apresentava doenças concomitantes (piómetra e carcinomas mamários) e sinais clínicos ligeiros (apenas poliartrite sendo este um sinal clínico menos observado na LCan, mais comum em outras DCTV para a qual não foi testada). Este animal poderia ter uma infecção recente e estar ainda em seroconversão ou estar numa fase de resolução da infecção, ou imunodeprimida pela existência de doença oncológica.

O cão D3, macho de 5 anos, em regime de interior, desparasitado, concomitantemente com atopia e otites bilaterais, com sinais clínicos perioculares e laboratoriais, a realizar córticos orais e tópicos, estava provavelmente em imunossupressão logo sem produção significativa de Ac ou tratar-se ainda de uma infecção recente e apresentar títulos de Ac baixos. Isto explicaria um resultado duvidoso para a técnica de IFI e positivo para a técnica de ELISA (Rz de 2,9), já que esta última tende a detetar precocemente os Ac circulantes.

O cão D4, fêmea de 11 anos, com um sinal clínico e laboratorial típico, diagnosticada com leishmaniose desde 2009 e medicada com alopurinol de modo irregular, positiva por IFI e ELISA na razão de 1,7, título baixo, provavelmente teve uma reinfeção ou agravamento da anterior (recaída), ainda em situação evolutiva.

O cão D5, fêmea de 7 anos, cão de exterior e coabitante com o cão D6, com vários sinais clínicos e laboratoriais, foi positiva em ambas as técnicas, logo tratava-se de um caso de LCan.

O cão D6, macho de 8 anos, cão de exterior e coabitante com o cão D5, com diversos sinais clínicos e laboratoriais, positivo em ambas as técnicas e com títulos altos (razão 3,6), tinha igualmente LCan.

O cão D7, macho de 5 anos, cão de exterior, desparasitado, com um sinal clínico suspeito (hiperqueratose das almofadinhas plantares, que se poderia unicamente dever a ser um cão

que habita no exterior) e um resultado laboratorial compatível, positivo em ambas as técnicas e com títulos altos, tinha de fato LCan.

O cão D8, macho de 8 anos, em regime exterior, desparasitado, com doenças concomitantes (displasia do cotovelo, otites e megaesófago), com sinais clínicos e alterações laboratoriais, positivo em ambas as técnicas e com títulos altos (razão 3,8), também tinha LCan.

O cão D9, fêmea de 5 anos, em regime misto, desparasitada, diagnosticada com LCan em 2012, a tomar alopurinol, apenas com sinais clínicos cutâneos (tosse emetizante tem como diagnósticos diferenciais traqueobronquite infecciosa canina, dirofilariose ou outros parasitas pulmonares), apresentou um resultado negativo em ambas as técnicas, tratando-se provavelmente de uma reinfeção ainda em evolução e seroconversão ou agravamento da infecção anterior (recaída).

O cão D10, macho de 9 anos, antigo cão errante, em regime misto, desparasitado, com sinais clínicos suspeitos, com litíase vesical e IRC concomitantes, diagnosticado com LCan em 2012, medicado com alopurinol desde essa data, foi negativo na técnica de IFI e positivo na de ELISA na razão de 1,9, título de Ac pouco elevado, provavelmente estava numa fase inicial de uma reinfeção ou agravamento da anterior (recaída). O resultado da técnica de ELISA pode dever-se a uma deteção precoce ou um resultado FP.

O cão D11, macho de 5 anos, antigo cão errante, em regime interior, desparasitado, com urolitíase e IRC concomitantes, com alguns sinais clínicos e laboratoriais, foi positivo em ambas as técnicas (ELISA com razão de 1,8, título pouco elevado), tratava-se de um caso de LCan.

O cão D12, macho de 10 anos, em regime misto, antigo cão errante, com diversos sinais clínicos e resultados laboratoriais, com IRC e espondilopatia anquilosante concomitantes, diagnosticado desde 2004, não medicado, positivo em ambas as técnicas serológicas com títulos altos na técnica de ELISA, sofreu provavelmente um agravamento da infecção antiga (recaída) ou uma reinfeção.

Em suma, a interpretação de um resultado positivo num teste serológico poderá ser: Num cão assintomático, um título positivo baixo (ou duvidoso) significa apenas contacto com o parasita; Persistência de Ac após o tratamento, pois os Ac mantêm-se por 6 a 12 meses, havendo casos onde permanecem por mais tempo apesar de melhoria clínica (Solano-Gallego *et al.*, 2001); Um aumento acentuado de Ac em futuros testes constitui um marcador de recaída (Oliva *et al.*, 2010; Solano-Gallego *et al.*, 2011); Possibilidade de persistência de Ac vacinais em cães cuja história se desconheça (Virbac, 2011).

Em suma, a interpretação de um resultado negativo num teste sorológico poderá ser: O animal não estar infetado; O animal pode estar infetado mas ainda não apresenta Ac circulantes que poderão demorar vários meses a surgir, entre 1 a 22 meses (Paltrinieri *et al.*,

2010); O animal pode estar infectado mas a concentração de Ac circulantes é insuficiente para ser detectada; A técnica não ser suficientemente sensível.

Apesar da sua simplicidade e aspeto prático, os testes sorológicos não possuem 100% de sensibilidade, pois alguns cães, particularmente os resistentes, os cães numa fase inicial da doença que ainda não produziram anticorpos, ou ainda em seroconversão, apresentam resultados negativos nos testes. Consequentemente, os resultados dos testes de diagnóstico têm de ser cuidadosamente estudados, sempre associando os resultados obtidos com a história pregressa do animal e o seu quadro clínico (da Silva *et al.*, 2006; Solano-Gallego *et al.*, 2009; Gramiccia, 2011).

A sensibilidade da técnica de IFI na deteção de cães infetados já foi analisada e reportada por diversos autores. A sensibilidade pode variar entre 68 a 100% e a especificidade entre 60 a 95% (Lira *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2007; Ferroglio, Centaro, Mignone, & Trisciuglio, 2007; Maia *et al.*, 2009; Alves *et al.*, 2012). Num estudo de Oliveira *et al.* (2005), em que compararam resultados de IFI e ELISA a partir de 30 amostras de cultura esplénica e 71 amostras de soro de cães saudáveis, das 30 amostras positivas, o teste ELISA detetou 27 amostras positivas, e o IFI apenas 12. Das 71 amostras de soro de cães clinicamente sãos, todas apresentaram resultados negativos na técnica de ELISA e uma apresentou resultado positivo no IFI. A sensibilidade e a especificidade foram respetivamente de, 90% e 100% para o teste ELISA e 40% e 98,6% para o teste de IFI. Um estudo realizado por Solano-Gallego *et al.* (2014) teve como objetivo comparar a performance de diagnóstico entre o teste rápido Speed Leish K[®], três testes comerciais ELISA (LEISCAN[®], ID Screen[®] e Leishmania 96[®]) e um teste IFI, em cães em vários estádios clínicos da infeção. Obtiveram-se as seguintes sensibilidades, relativamente às duas técnicas em questão no nosso trabalho: LEISCAN[®] (92.5%), IFI (86.9%); e especificidades de 100% e 91.7%, respetivamente. No geral, o teste ID Sreen[®] apresentou os melhores resultados. Também num estudo que avaliou o desempenho do teste ELISA LEISCAN[®], obteve-se uma sensibilidade de 98% e uma especificidade de 100%, à semelhança deste último (Rodríguez-Cortés, Ojeda, Todolí & Alberola, 2013).

Neste estudo, apenas foi possível fazer a compararação dos resultados da técnica de ELISA com a de IFI relativamente à sensibilidade e especificidade. Assim, no grupo A a técnica de ELISA apresentou 100% de Sensibilidade, nos grupos B e C 100% de Especificidade, e no grupo D, 78% de Sensibilidade e 100% de Especificidade.

Certos autores afirmam que o método de ELISA demonstra maior sensibilidade e especificidade comparativamente com o método de IFI (Evans *et al.*, 1990, citados por Moreira *et al.*, 2007), questionando o seu papel como *gold standard*. Outro problema desta técnica é número de FP que pode gerar (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008; Vargas-Duarte, López-Páez, Escovar-Castro & Fernández-Manrique, 2009) essencialmente devido a reações cruzadas com outros hemoparasitas (Martínez *et al.*, 2011), sendo que ao

existir uma suspeita clínica forte, deve-se repetir o teste com outro teste quantitativo mais sensível (Paltrinieri *et al.*, 2010), como um qPCR e recorrer-se sempre que possível a uma eletroforese das proteínas séricas (proteinograma). Esta análise bioquímica permite auxiliar no diagnóstico e é considerada um dos melhores meios de monitorização da evolução da doença e resposta ao tratamento, permitindo detetar eventuais recidivas (Roze, 2005; Noli *et al.*, 2006, citados por Barbosa, 2011). No entanto, apesar de existir hipergamaglobulinémia em 80% dos cães doentes, esta não é patognomónica desta doença (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008).

Na prática clínica também se faz recorrentemente a conjugação de uma punção medular (diagnóstico parasitológico) com uma técnica serológica para o diagnóstico de Leishmaniose (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

É importante saber qual o limiar de positividade (*cut-off*) da técnica uma vez que este varia com o laboratório e com o método utilizado, desde 1:40 a 1:320 (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008; Paltrinieri *et al.*, 2010).

As desvantagens destas técnicas sorológicas baseiam-se no valor de *cut-off* depender de cada laboratório, não existindo uma padronização; gerar FN em cães ainda em seroconversão ou imunodeprimidos, logo, títulos de Ac baixos ou ausentes em cães com sinais clínicos e em zona endémica, requerem uma pesquisa mais exaustiva (Solano-Gallego *et al.*, 2011) assim como a instituição de terapêutica.

Embora a produção de Ac seja baixa em fases iniciais ou tardias da infeção ou em cães com infeção assintomática, estes animais infetados habitual e gradualmente desenvolvem títulos de Ac crescentes ao longo dos meses (Oliva *et al.*, 2006). No entanto, apenas a presença de Ac anti-*Leishmania*, como já foi referido, não é equivalente a doença, logo é aconselhada a realização de mais do que um teste serológico para obtenção de um melhor diagnóstico de LCan (Campino, 2002) assim como para realizar a monitorização do tratamento, com testes de 3 em 3 meses (Baneth & Aroch, 2008; Maia & Campino, 2008). Solano-Gallego *et al.* (2009) recomendam a repetição de um teste serológico seis meses após o início do tratamento para monitorização da evolução da doença. A diminuição do título de Ac só se considera significativa se houver uma diferença de pelo menos duas diluições entre testes. Justifica-se então realizar igualmente testes serológicos em cães sãos se forem dadores de sangue, em situações de estudos epidemiológicos, situação de deslocações para zonas não endémicas ou a pedido dos proprietários para monitorização do seu animal (Solano-Gallego, *et al.*, 2011).

Avaliação dos resultados obtidos na técnica de qPCR - Diagnóstico Molecular:

A técnica de qPCR foi usada em amostras de pele, com o intuito de verificar a sua eficácia na deteção de DNA do cinetoplasto de *L. infantum* neste tipo de amostra. Podem usar-se vários tipos de amostra biológica, enumeradas por ordem decrescente de sensibilidade, como: medula óssea ou linfonodo, pele, zaragatoas conjuntivais, *buffy coat* e sangue

periférico (Paltrinieri *et al.*, 2010). Nos últimos anos, vários métodos de qPCR foram desenvolvidos visando a detecção do parasita e o diagnóstico da LCan (Mary *et al.*, 2004; Manna *et al.*, 2006; Maia & Campino, 2008). Gomes *et al.* (2007) reforçam que a inclusão da técnica de PCR no diagnóstico de Leishmaniose pode ser uma ferramenta sólida para um diagnóstico precoce e uma rápida tomada de decisões. Estudos longitudinais conduzidos por Quinnell *et al.* (2001) revelaram que o PCR tem uma sensibilidade elevada imediatamente após a transmissão, que diminui para cerca de 50% com a evolução da infecção. O diagnóstico molecular é também muito útil para os casos duvidosos por outras técnicas, na detecção da persistência da infecção em cães tratados e clinicamente curados, assim como nos casos de reinfeção.

Atualmente o qPCR é mais sensível e reprodutível que o cPCR e pode substituí-lo no diagnóstico de rotina (Paiva-Cavalcanti, Regis-da-silva & Gomes, 2010). A técnica de qPCR ao permitir a quantificação da carga parasitária de um modo preciso, torna-se eficaz na confirmação do diagnóstico de LCan, especialmente, nos casos em que a sorologia é inconclusiva, nos casos em que o cão ainda não sofreu uma seroconversão, na monitorização do tratamento (Vitale *et al.*, 2004; Moreira *et al.*, 2007; Martínez *et al.*, 2011). Permite a avaliação das variações da carga parasitária e a resposta à terapêutica, antes e depois de ser iniciada, prevendo futuras reinfeções através do DNA residual do protozoário presente nos tecidos (Maia *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2011). Apesar do qPCR poder detetar infeções muito recentes, nem sempre o local onde é feita a colheita, neste caso por raspagem cutânea, contém o parasita pelo que podem existir resultados FN.

É importante salientar que um resultado proveniente destas técnicas moleculares, deve ser averiguada conjuntamente com os dados clinicopatológicos obtidos e técnicas serológicas. Não é recomendada a decisão de tratar animais positivos clinicamente saudáveis baseada apenas em métodos moleculares (Solano-Gallego, *et al.*, 2011).

Nos casos positivos a qPCR, é recomendada a monitorização da carga parasitária um mês após o início do tratamento para avaliar a resposta do animal. Se a carga parasitária diminuir, o tratamento foi eficaz e um novo controlo com qPCR é recomendado no fim do tratamento, 6 a 12 meses após ter sido iniciado (Martínez *et al.*, 2011).

Em cães com uma resposta imunitária eficaz contra a *Leishmania* sp., a infecção pode não ser seguida por uma disseminação do parasita. Assim, em regiões geográficas endémicas, onde 60% dos animais são positivos por PCR, resultados positivos nesta técnica quando não existem lesões cutâneas visíveis, não estão necessariamente associados ao estabelecimento de infecção ou desenvolvimento de doença (Paltrinieri *et al.*, 2010). No entanto, um resultado positivo deve ser tido em maior consideração se se tratar de animais dadores de sangue ou animais destinados a exportação para zonas não endémicas onde existam vectores de LCan.

Como desvantagens, o qPCR necessita de operadores experientes, tem custos elevados, não revela o estado imunológico do animal e precisa de ser conjugado com outra técnica de diagnóstico na confirmação da doença (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

Existem vários fatores com impacto no valor absoluto de Ct, além da concentração da molécula alvo, tal como a eficiência da reação PCR que depende diretamente da técnica usada, do desempenho do “TaqMan® Gene Expression Mastermix” e da qualidade da amostra (Applied Biosystems, 2014). Valores de Ct acima de 35 representam resultados falso-positivo com uma carga parasitária residual (Paiva-Cavalcanti, Regis-da-Silva & Gomes, 2010). Quanto menor o valor de Ct, maior o valor da carga parasitária do animal.

A amplificação do DNA do parasita a partir de amostras de pele, pode indicar exposição primária ao flebótomo infetado ou uma infeção ativa em cães imunocompetentes, ou ambas (Solano-Gallego *et al.*, 2004; Otranto *et al.*, 2009).

Relativamente aos resultados obtidos pela técnica de qPCR, no grupo A: 86% (6/7) dos cães obtiveram um resultado positivo, tendo o cão A6 obtido um resultado negativo. No grupo B, 80% (8/10) dos cães obtiveram um resultado negativo, enquanto que, os cães B5 e B9 obtiveram um resultado positivo. No grupo C, 90% (9/10) dos cães obtiveram um resultado negativo, enquanto que o cão C10 obteve um resultado positivo (36,7). No grupo D, 42% (5/12) dos cães obtiveram um resultado positivo (cães D2 - 40,5; D5 - 32; D6 - 34,7; D8 - 28; D11 - 23,4), enquanto que, 58% (7/12) obtiveram um resultado negativo.

Dos animais do grupo A, apenas o cão A6 apresentou um resultado negativo. Os restantes animais ao terem sinais clínicos de LCan e serologia positiva, teriam uma infeção ativa com um menor ou maior título de Ac circulantes. Alguns animais embora tivessem um resultado positivo no qPCR, apresentaram uma carga parasitária residual, caso dos cães A2, A4 e A5. Estes provavelmente terão uma infeção mais antiga que os restantes cães.

O cão A6 tinha diversos clínicos e apresentava serologia positiva, este resultado negativo pode dever-se a uma possível interferência na extração do DNA (algum inibidor na reação de extração de DNA que impossibilitou a posterior deteção do mesmo) ou porque o local escolhido para a raspagem não continha o DNA do protozoário.

No grupo B, os animais B5 e B9 apresentaram um resultado positivo no qPCR, no entanto com valores de Ct na ordem dos 39.

O cão B5, fêmea com 13 anos, não tinha nenhum sinal compatível com LCan nem alterações laboratoriais, e apresentava serologia negativa, o que pode significar que houve contato e se instalou uma infeção que o animal debelou, ou se tratava de uma infeção recente e assintomática e o animal poderia estar ainda em seroconversão. O resultado positivo na técnica de qPCR pode significar que o animal foi exposto ao vetor ou, menos provavelmente, tratar-se de um resultado FP. Os resultados FP podem ocorrer por contaminação cruzada e falta de amplificação específica do DNA. A contaminação introduzida pelo pessoal, controlos positivos ou amostras positivas pode ser minimizada pela

separação das áreas de trabalho (Real-Time PCR Research and Diagnostic Core Facility, 2011).

O cão B9, fêmea com 9 anos, apresentava sinais clínicos compatíveis com LCan e apresentou serologia negativa, podendo tratar-se de um caso semelhante ao anterior. Neste animal seria importante o DD com dermatofitoses, sarna, doenças hepáticas.

No grupo C, apenas o animal C10 obteve um resultado positivo com um valor de Ct alto (36,7), logo uma baixa carga parasitária estava presente. Este animal era clinicamente saudável, podendo este resultado pode tratar-se apenas de um contato com o parasita e estabelecimento de uma resposta imunitária eficaz ou tratar-se de um portador assintomático com o animal ainda esteja em seroconversão, ou simplesmente um FP (contaminação da amostra). Em zona endêmica um resultado positivo a PCR na ausência de sinais clínicos não deve ser valorizado quanto à instituição de terapêutica. O animal deverá ser observado e monitorizado após 1 a 2 meses para avaliar a presença de infecção/doença (Paltrinieri *et al.*, 2010; Solano-Gallego *et al.*, 2011).

Relativamente ao grupo D, obtiveram-se resultados positivos na técnica de qPCR apenas para os cães D2 (40,5); D5 (32); D6 (34,7); D8 (28) e D11 (23,4).

O cão D1 apresentou um resultado negativo na técnica de qPCR, um resultado positivo na IFI e ELISA, podendo tratar-se de uma infecção recente estando o animal ainda em seroconversão ou ainda numa fase mais avançada da infecção. De referir novamente que a técnica de qPCR tem uma sensibilidade elevada imediatamente após a transmissão, e diminui para cerca de 50% à medida que a infecção progride. Outra hipótese é tratar-se de um resultado FN ou o local da raspagem não conter DNA do protozoário. Com este quadro este animal deveria iniciar tratamento.

O cão D2 apresentou uma carga parasitária extremamente baixa e um resultado negativo na sorologia. Este animal poderia ter uma infecção recente e estar em seroconversão ou estar numa fase de resolução da infecção e vir a apresentar uma cura clínica espontânea, além disso os sinais clínicos são um pouco inespecíficos para LCan e concordantes com as outras doenças concomitantes. Poderá também dar-se o caso de a infecção ser antiga e pelo cão ser idoso e poder estar imunodeprimido e não produzir Ac. Houve um contato com o vetor mas a carga parasitária inoculada pode ter sido mínima ou o parasita estar presente no local da raspagem em muito pouca quantidade. Não se iniciaria o tratamento neste caso.

O cão D3 com um resultado negativo na técnica de qPCR, duvidoso na de IFI e positivo na ELISA pela terapêutica instituída (corticóides orais e tópicos), estaria provavelmente em imunossupressão logo sem produção significativa de Ac, poderia tratar-se também de uma infecção recente ou antiga com baixo título de Ac. Este resultado da qPCR poderá dever-se a uma baixa carga parasitária inoculada pelo vetor ou o local da raspagem não conter DNA de *Leishmania*. Com este quadro este animal deveria iniciar tratamento.

O cão D4, com um resultado negativo na técnica de qPCR, positivo na serologia, diagnosticado com leishmaniose desde 2009, medicado com alopurinol de modo irregular, provavelmente teve uma recaída ou reinfeção ainda em situação evolutiva. O cão era desparasitado, a infecção foi diagnosticada há anos, pode não ter havido novo contato com o vetor e o DNA parasitário encontrar-se em quantidade mínima ou ausente no local da raspagem. Com este quadro este animal deveria iniciar tratamento.

O cão D5, com resultado positivo (32) na técnica de qPCR, mas com uma carga parasitária pouco significativa, com resultado positivo na serologia, tinha LCan. Este cão deveria iniciar tratamento.

O cão D6, com resultado positivo (34,7) na técnica de qPCR e resultado positivo na serologia, tinha LCan e é um caso que requereria terapêutica.

O cão D7, com resultado negativo na técnica de qPCR e positivo na serologia, tinha LCan e deveria iniciar tratamento. O resultado negativo poderá ser um FN, a raspagem cutânea não ter contemplado o local com DNA inoculado ou tratar-se de um FN (inibição da reação de extração do DNA).

O cão D8, com resultado positivo na técnica de qPCR (28), equivalente a uma carga parasitária relativamente alta, e com um resultado positivo na serologia, tinha LCan e deveria iniciar tratamento.

O cão D9, com resultado negativo nas três técnicas, a tomar alopurinol desde 2012 e apenas com sinais clínicos e sem alterações laboratoriais, tratou-se provavelmente de um cão que obteve uma cura clínica e que recentemente se reinfectou ou cuja infecção se reativou através de formas parasitárias acantonadas devido a um possível aumento do stress do animal, estando ainda em seroconversão. Estava desparasitado, poderá não ter voltado a contatar com o vetor ou o DNA do parasita na pele não ter sido contemplado na raspagem ou estar presente em muito pequena quantidade naquele local.

O cão D10, negativo na técnica de qPCR, negativo para IFI e positivo para ELISA, diagnosticado em 2012, medicado com alopurinol, provavelmente estaria numa fase inicial de uma reinfeção ou de recaída, ainda com baixos títulos de Ac. O local da raspagem poderia não conter o DNA do parasita ou encontrar-se em quantidade muito pequena, ou tratar-se de um FN.

O cão D11, positivo na técnica de qPCR (23,4) com uma carga parasitária alta, com resultado positivo também na serologia, tratava-se de um caso de LCan. Este animal deveria iniciar tratamento.

O cão D12, com resultado negativo na técnica de qPCR mas positivo em ambas as técnicas serológicas, diagnosticado com LCan em 2004, sofreu provavelmente uma recaída ou uma reinfeção, encontrando-se provavelmente numa fase avançada tanto pelos sinais clínicos como alterações laboratoriais. Novamente, o resultado negativo na técnica molecular poderá

representar um FN ou ausência do DNA parasitário no local da raspagem. É recomendado o início do tratamento.

Em suma, a interpretação de um resultado positivo num teste molecular poderá ser: Contato com o vetor e ausência de infecção e de sinais clínicos; Contato com o vetor e presença de infecção; FP por contaminação cruzada durante os procedimentos de realização da técnica.

Em suma, a interpretação de um resultado negativo num teste molecular poderá ser: Local ou órgão da biópsia não contemplar o DNA do protozoário, Falta de sensibilidade da técnica face ao material usado; Resultado FN por interferência de algum inibidor na reação de extração de DNA.

A técnica de qPCR apresenta ótimos resultados comparativamente com outros tipos de PCR (Reis *et al.*, 2013). Cada vez mais são usadas amostras de pele, em vez de biópsias de baço pois constituem recolhas menos invasivas e com uma sensibilidade muito semelhante (97,3 e 100%, respetivamente). Uma das principais preocupações acerca das biópsias de baço é o risco de hemorragia grave que pode resultar na morte do animal. A pele de um cão infetado representa um papel importante na transmissão do parasita quer a outros cães como ao Homem. A partir de uma infecção cutânea o parasita dissemina-se para os restantes órgãos (Reis *et al.*, 2013).

Influência dos diversos fatores de risco na infecção por *L. infantum* e na LCan:

No grupo A, 86% eram machos, maioritariamente inteiros, em média entre 1 a 7 anos. No grupo B, 50% eram machos inteiros, 2 cães tinham entre 1 - 3 anos, 3 cães tinham entre 4 - 7 anos, 2 cães entre 8 - 10 anos e 3 cães entre os 11 - 13 anos. No grupo C, 70% eram machos, maioritariamente inteiros, apenas 2 cães eram jovens, 5 tinham entre 4 - 7 anos e 3 entre 8 - 10 anos. No grupo D, 67% dos cães eram machos, maioritariamente inteiros, 5 cães tinham entre 4 - 7 anos, 5 cães entre 8 - 10 anos e 2 cães eram geriátricos. Verificou-se que os cães infetados por *L. infantum* eram maioritariamente do sexo masculino, na idade adulta (4 a 7 anos) ou geriátrica (8 a 13 anos). Embora nos grupos B e C, se verifique também a predominância de cães do sexo masculino, a maior parte com idades compreendidas entre os 4 e os 10 anos. Uma vez que o número total de machos e fêmeas, assistidos no HEFMV não foi estabelecido, esta maior frequência de indivíduos do sexo masculino poderá dever-se apenas a estarem em maior número na população, levantamento ainda não realizado.

Alguns autores referem haver predisposição para a leishmaniose nos machos (Slappendel, 1988; Miranda *et al.*, 2008), mas outros autores já não associam o sexo a uma maior probabilidade de contrair Leishmaniose (Amusategui, Sainz, Rodriguez, & Tesouro, 2003; Dantas-Torres *et al.*, 2006; Mesquita de Figueiredo *et al.*, 2014).

A opinião relativamente à influência da idade varia consoante os autores. Uns descrevem ser mais frequente em cães adultos (Almeida, Mendonça & Sousa, 2010), outros referem dois picos de prevalência da doença: antes dos 3 e após os 8 anos de idade (Cardoso *et al.*,

2004; Solano-Gallego *et al.*, 2011) ou outros que descrevem não existir predisposição quanto à idade (Amusategui *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2010). Os animais mais novos tendencialmente passam mais tempo em casa, resguardados da picada do inseto vetor (Miranda *et al.*, 2008). Os cães geriátricos habitualmente têm outras doenças concomitantes, que contribuem para uma quebra da imunidade, alterando a relação de equilíbrio entre o parasita e o hospedeiro (Miranda *et al.*, 2008).

Relativamente à raça, no grupo A, não houve nenhuma raça representativa, sendo que 57% dos animais apresentava grande porte. No grupo B, 40% eram cães SRD e 20% da raça Retriever do Labrador, 50% dos animais tinham porte pequeno, seguidos dos de porte grande e médio. No grupo C, 40% eram também cães SRD, sendo 40% da população de porte médio e 40% de porte pequeno. No grupo D, 42% eram SRD, 25% da raça Pastor Alemão e 17% da raça Retriever do Labrador, e no qual 75% dos animais era de grande porte.

Os cães SRD predominaram na população, seguidos dos cães da raça Cão de Pastor Alemão e Retriever do Labrador. Isto poderá dever-se ao facto dos cães SRD, da raça Cão de Pastor Alemão e Retriever do Labrador se poderem encontrar em maior número na população total de pacientes do HEFMV, no entanto este levantamento nunca foi realizado. Curiosamente as raças mais representativas são todas raças de grande porte e muitas das quais associadas como sendo cães de exterior, estando por isso mais expostas ao vector.

De acordo com a literatura, todas as raças são suscetíveis à infeção, embora algumas, como a raça Boxer, Cocker Spaniel, Rottweiler, Cão de Pastor Alemão, Beagle e Mastim Napolitano sejam mais suscetíveis do que outras (França-Silva *et al.*, 2003; Baneth *et al.*, 2008; Miranda *et al.*, 2008). Amusategui *et al.*, (2003) demonstraram haver maior predisposição de cães SRD e de raça Pastor Alemão face às restantes. Tendo em conta o estudo de Cortes *et al.* (2012) animais puros apresentam maior predisposição que os sem raça definida. Outros autores defendem que não existe predisposição rácica (Slappendel, 1988).

Os animais de porte gigante, grande e médio passam frequentemente mais tempo no exterior, o que poderá explicar a frequência da infeção nestes cães. As raças de porte pequeno são mais frequentemente mantidas no interior da habitação, havendo por isso uma menor exposição ao vetor. Verificou-se que os animais não infetados apresentavam maioritariamente porte pequeno ou médio, enquanto que os animais infetados eram maioritariamente de porte grande.

Relativamente ao comprimento da pelagem, no grupo A a maioria tinham pelagem curta, no grupo B 50% pelagem média e 30% pelagem curta. No grupo C 50% tinha pelagem média e 40% pelagem curta. No grupo D, 50% pelagem curta e os outros 50% pelagem média.

Verifica-se que os cães infetados por *L. infantum* têm maioritariamente a pelagem curta ou média, mas o mesmo se verifica nos cães dos grupos B e C.

Segundo (Cortes *et al.*, 2012) são os cães de pelagem curta que apresentam maior seroprevalência (6,7%), uma vez que os flebotomos se alimentam, preferencialmente, de zonas de pêlo pouco denso, como cabeça, focinho, pavilhões auriculares, áreas inguinais e perineais (Solano-Gallego *et al.*, 2009). A literatura é um pouco escassa relativamente a este fator de risco, pelo que é difícil confrontá-lo entre estudos. O comprimento do pêlo poderá estar associado à taxa de infeção, uma vez que o flebotomo terá maior facilidade em atingir a pele de um cão de pêlo curto do que a de um cão de pelagem comprida. No entanto as zonas corporais referidas serão sempre locais mais fáceis de atingir em cães com qualquer tipo de pelagem.

Relativamente à proveniência dos animais, este conhecimento pode ter significado na medida em que ao tratar-se de um cão que tenha sido oferecido ao proprietários ou adotado numa campanha, não se teve acesso ao seu historial, e ao tipo de vida a que o animal esteve sujeito anteriormente. Um cão que estivesse num canil municipal ou tivesse sido apanhado na via pública, tratava-se de um animal errante, o que contribui para a exposição ao inseto vetor durante um determinado e longo período de tempo. Não se verificou nenhum padrão deste fator de risco relativamente aos cães infetados, em todos os grupos existiram diversas proveniências.

Quanto ao local de habitação, no grupo A, existiu predominância dos cães habitantes no exterior, seguidos dos de regime misto. No grupo B, metade eram cães de exterior e metade de regime misto. No grupo C, 80% habitava em regime misto e 20% (2/10) no interior. No grupo D, 50% habitava no exterior, 33% em regime misto e 17% no interior. Estas frequências de cães infetados a viver em regime exterior mas também misto, podem ser indicativas de que, como já mencionado, uma maior exposição de um cão que viva em regime exterior (e misto) ao vetor, implica uma maior probabilidade de contrair a infeção. Verifica-se que nos grupos B e C não existem cães em regime exterior, sendo a maioria habitantes com regime misto.

O fator nº de passeios diários pode ser importante na medida em que um cão que passeie mais vezes por dia, especialmente ao amanhecer e ao crepúsculo, tenha maior probabilidade de se expor ao vetor ao percorrer a área geográfica envolvente, do que os cães que não saem da sua habitação. Neste estudo, não existem animais que passem antes do nascer do sol, e os animais que não realizam passeios têm sempre acesso ao exterior (animais em regime misto ou exterior). Nos grupos A e D, a maioria dos cães não realizava passeios ou realizava apenas entre 1 a 2, estes sempre no final do dia, ou manhã e fim de dia, respetivamente. No entanto nos grupos B e C, metade dos animais também realizava 1 a 2 passeios diários. Não se verificou nenhum padrão de infeção quanto ao nº de passeios por dia. Este fator é bastante dependente da zona de habitação (local envolvente, lagos, vegetação, etc), pormenor a que não se teve acesso em conversa com os proprietários dos animais.

Quanto ao concelho de residência, todos os animais dos 4 grupos habitavam em zonas endémicas de Leishmaniose, pois quase todas as regiões do país de norte a sul podem ser endémicas (Campino *et al.*, 2006; Armés, 2010; Maia *et al.*, 2010; Reisinho, 2010; Maia, 2012; Vieira, 2014). O importante a ter em conta é a taxa de prevalência estimada para os diferentes concelhos, a profilaxia que os proprietários realizam aos seus animais e se estes se deslocam pelo país e alturas do ano em que o efetuam. No grupo A, apenas um animal viaja pelo país, para Alcácer do Sal na época de Outono/Inverno. Este animal é um cão de exterior, com uma desparasitação externa incorreta e que serve de foco de infeção para os cães com quem cohabita e para os outros cães em geral.

Os animais do grupo B vivem na Área metropolitana de Lisboa e 50% deslocavam-se para zonas como Coimbra no verão, para o Porto no Inv./Prim., e outras regiões como Sertã, Portalegre, mensalmente, e Leiria semanalmente. Estes animais estavam todos protegidos com coleira e/ou *spot on*, excepto o cão B7 que viajava para a Sertã mensalmente. Este cão representa um risco para o animal com quem convive e para os outros em geral.

No grupo C, 50% deslocava-se pelo país, para zonas como a Lousã, Évora ou Faro nos meses de verão, ou por todo o país o ano inteiro. Todos estes cães estavam bem desparasitados excepto os cães C6 e C9, que faziam administrações trimestrais de *spot on*. Estes dois animais apresentam um maior risco de contrair a infeção por onde quer que se desloquem.

No grupo D, 67% deslocava-se por Portugal. Destes animais, que viajavam todo o ano ou nos meses de Verão, de regime misto ou exterior, apenas 6/8 faziam uma desparasitação correta (coleira ou *spot on*). Os restantes deveriam ter uma boa profilaxia para não terem sido infetados e tornarem-se infetantes para outros cães, coabitantes ou não.

De acordo com estudos anteriormente mencionados, estas deslocações fazem com que o animal viaje para zonas endémicas e corra o risco de vir a infetar outros cães da mesma região onde habita (Campino *et al.*, 2006; Maia *et al.*, 2010). Como já se referiu e de acordo com a bibliografia, o flebótomo é mais ativo em Portugal nos meses de maior calor, Abril a Outubro, e nas horas de luz crepuscular (Cross & Hyams, 1996; Killick-Kendrick & Killick-Kendrick, 1999; Greene, 2006). Este fator foi o único que apresentou um resultado estatístico significativo no grupo D ($p < 0,04$).

Torna-se notória e essencial a importância de uma correta profilaxia durante toda a vida do animal, quer num animal saudável quer num já infetado, especialmente os com origem errante aquando da sua aquisição. Um cão saudável corretamente desparasitado, tem uma maior probabilidade de não ser infetado pelo inseto vetor e um cão infetado torna-se menos propício de constituir fonte de infeção para o flebótomo.

No grupo A, metade dos cães convivía com outros cães, sem sinais ou suspeita de infeção por Leishmaniose e a outra metade era o único animal em casa. No grupo B, 50% não coabitava com outros animais e 40% coabitava com outros cães, sem suspeita de LCan

(metade convivia simultaneamente com gatos). No grupo C, 70% coabitava com outros cães, sem suspeita de LCan, 30% com chinchilas ou aves e peixes. No grupo D, 67% coabitava com outros cães, 25% era o único animal em casa e apenas 1 animal convivia com outros cães e um réptil. Deste último grupo, os cães D5 e D6 viviam juntos, sendo os únicos a conviver com outro portador de LCan, ambos cães de exterior habitantes de Lisboa.

Segundo a literatura, sendo o cão o hospedeiro reservatório principal e o elemento primário de infecção de um flebótomo (Abranches et al., 1998; Solano-Gallego, 2004), quanto maior a convivência com outros cães maior é a probabilidade de um vetor se infectar e perpetuar a infecção em cães da mesma área de residência. Neste estudo apenas 5 cães cohabitavam com animais exóticos, dos quais apenas 2 estavam infectados e cohabitavam com aves e um réptil. Sabe-se que os parasitas do género *Leishmania* podem infectar répteis e muitas ordens de mamíferos, e têm uma distribuição mundial mas apenas nas regiões tropicais e subtropicais (Ashford, 2000). Estes parasitas do género *Leishmania* presentes nos répteis, foram classificados num género separado – *Sauroleishmania* (Cupolillo et al., 2000). Logo, o género que afeta o cão é diferente do subgénero que afeta um réptil. O vetor deste parasita, *Sergentomyia minuta*, é abundante na região do Algarve, mas desconhece-se até à data, casos de infecção por este subgénero no nosso País (Maia et al., 2013).

Relativamente à desparasitação externa, verificou-se que praticamente 100% dos proprietários conhece e aplica aos seus animais unções puntiformes contendo Permetrina e Imidaclopride e/ou coleiras impregnadas em Deltametrina, com eficácia comprovada contra os flebótomos. No caso dos animais que usam ambos os produtos, terão uma proteção substancialmente maior (Miró et al., 2007; Bayer, 2011). No entanto, apesar de toda a sensibilização publicitária e médico-veterinária existente atualmente, relativamente poucos animais eram corretamente desparasitados. Mais grave se torna quando, aos cães diagnosticados com LCan, os proprietários nem sequer aplicam um único produto inseticida de um modo correto tornando a desparasitação externa uma tarefa irregular e ineficaz, como no caso dos cães A3, A4, A6, D1, D2 e D12, constituindo um risco para a perpetuação da infecção por *L. infantum*.

Apenas 67% dos proprietários desparasitavam corretamente os seus animais. No geral, verificou-se que as pessoas preferem a aplicação de produtos *spot on* ou conjugar ambos os produtos, em vez de aplicar apenas coleira.

Relativamente à desparasitação interna, mais de metade dos cães dos respetivos grupos eram corretamente desparasitados. No entanto, pela periodicidade que é exigida entre cada desparasitação, esta poderia tornar-se um gesto muito mais natural e regular por parte dos proprietários dos animais, garantindo desta forma a profilaxia e estado hígido dos animais face aos parasitas internos que os afetam.

Relativamente à opinião dos proprietários acerca da prevenção de Leishmaniose, verificou-se que apenas 29% dos proprietários dos cães do grupo A considerava fazer a prevenção; no grupo B, apenas 40%; no grupo C, 70% e no grupo D, 67%. O fato de certos proprietários aplicarem pelo menos um dos produtos ectoparasiticidas aos seus animais e afirmarem não fazer a prevenção contra Leishmaniose, leva a crer que ainda existem muitas pessoas mal informadas acerca dos produtos que aplicam aos seus animais. O oposto também se verifica, proprietários que aplicam incorretamente os desparasitantes e afirmam prevenir a LCan. Estes fatos são alarmantes assim como a existência de proprietários que não realizam de todo a desparasitação externa aos seus cães.

Foi igualmente inquirido acerca do conhecimento da doença por parte dos proprietários dos animais. No grupo A, 71% dos proprietários tinham conhecimentos acerca de leishmaniose, no grupo B 80%, no grupo C 90% e no grupo D 92% conheciam este tema. Tanto os proprietários de cães sem e com LCan conhecia na sua grande maioria a doença, quer respetivamente, pela prevenção que efetuam e informação que procuram, quer pela informação que foram adquirindo pelo fato de possuírem um animal infetado.

Dada a importância deste tema e a informação que atualmente existe acerca dele assim como pela diversidade de métodos profiláticos, é de fato intrigante o número de pessoas que ainda o desconhece e que não realiza um manejo preventivo ao seu animal de estimação.

Análise estatística:

O teste escolhido para realizar a análise estatística foi o Teste Exato de Fischer devido ao fato da população ser inferior a quarenta animais ($N < 40$) e proporcionar um menor erro que o Teste de Qui-Quadrado (χ^2).

Visto a técnica de IFI ser o *gold standard* para o diagnóstico de Leishmaniose, fez-se uma comparação da técnica de ELISA relativamente à de IFI, a qual permitiu afirmar com 95% de confiança, que e apenas para a população em geral, é indiferente usar qualquer uma das técnicas pois obtém-se o mesmo resultado serológico. A nível de cada grupo já não se rejeitou a hipótese H_0 - IFI vs ELISA independentes. Provavelmente por a amostra deste estudo ter um tamanho reduzido, que se torna mais significativo quando dividida pelos quatro grupos. No entanto a análise estatística foi realizada para cada grupo, de acordo com os objectivos deste trabalho. Visto que a técnica de qPCR é uma técnica molecular, não se pôde realizar uma comparação dos resultados obtidos com os das técnicas serológicas. Assim sendo, só se efetuou análise estatística desta técnica a nível dos fatores de risco.

Usando o mesmo pressuposto, afirmou-se também que no grupo A a técnica de ELISA apresentou 100% de Sensibilidade, nos grupos B e C 100% de Especificidade, e no grupo D, 78% de Sensibilidade e 100% de Especificidade. Comparativamente com os valores referidos ao longo deste trabalho, estes valores são bastante satisfatórios.

Neste estudo foram avaliados os diversos fatores de risco para a infeção por *Leishmania* já anteriormente mencionados, para cada grupo. Estatisticamente verificou-se uma associação entre a técnica de qPCR, o grupo D e a época do ano em que o animal viajava por Portugal ($p < 0,05$). A maioria dos animais infetados deslocava-se pelo país o ano inteiro e não apenas nos meses de maior calor. É provável que esta doença esteja a perder alguma sazonalidade, devido à alteração do clima global, afectando a distribuição do vector e do agente (Kramer, 2008, citado por Moita, 2012), alargando por isso a época favorável dos flebótomos. Deste modo, os cães que passeiam todo o ano sofrem uma exposição ao vetor mais alargada o que contribui para um maior número de resultados positivos na técnica de qPCR.

Embora não se tenham encontrado mais fatores com um resultado estatístico significativo, vários já foram também analisados pelos diversos autores descritos ao longo deste texto, como sendo igualmente importantes na contribuição para a infeção por *Leishmania*, uns mais decisivos que outros de acordo com o autor.

Procurou-se também verificar se os mesmos fatores de risco teriam influência nos resultados FP gerados pela técnica de ELISA. Desta análise não resultaram associações estatísticas. Tem sido afirmado que a técnica de ELISA é mais sensível e específica que a de IFI, deste modo os ditos resultados FP poderão não ser influenciados por nenhum fator e dever-se apenas à sua desvantagem de ser uma técnica que apresenta FP ou à sua capacidade de deteção precoce de Ac circulantes (Pereira da Fonseca & Villa de Brito, 2008; Vargas-Duarte, López-Páez, Escovar-Castro, & Fernández-Manrique, 2009).

De referir novamente, que a amostra sendo constituída por 39 animais implica bastantes reservas na extrapolação dos resultados para a população canina em geral.

Por fim, é de salientar que o trabalho laboratorial e clínico realizado, contribuiu para a aquisição de competências fundamentais para o desenvolvimento futuro da atividade profissional da autora, na área da Clínica de Animais de Companhia, assim como, para adquirir noções práticas sobre as três técnicas de diagnóstico laboratorial em questão.

Como perspectivas futuras no diagnóstico de LCan, irá ser comercializado em Portugal, em 2017, um novo *kit* de diagnóstico cuja vantagem é detectar casos precoces de LCan mesmo em cães assintomáticos, conseguindo detetar o início da infeção sem que o cão tenha desenvolvido uma resposta imunológica evidente (Marvão, 2014).

5. Conclusão

A maioria dos proprietários dos animais estavam familiarizados com este tema mas apenas cerca de metade dos proprietários realizavam uma correta profilaxia ectoparasiticida ao seu animal de estimação. O que constitui um perigo ainda maior no caso dos cães infetados, inclusivamente para a saúde pública.

Neste estudo, os animais mais afectados foram animais do sexo masculino, adultos e maioritariamente de grande porte.

A época do ano em que os animais viajavam revelou ter importância a um nível estatístico.

Ambas as técnicas serológicas detetaram apenas animais positivos no Grupo A (100% - 7/7) e apenas animais negativos nos Grupos B (100% - 10/10) e C (100% - 10/10). A técnica de diagnóstico serológico que detetou uma maior quantidade de animais positivos no grupo D foi a técnica de ELISA, 83% (10/12), enquanto a técnica de IFI detetou apenas 58% (7/12).

O uso de amostras cutâneas na técnica de qPCR pareceu ser uma boa aposta para futuras análises, na medida em que se detetaram 86% de resultados positivos no Grupo A, 80% de resultados negativos no Grupo B, 90% de resultados negativos no grupo C, e 42% de resultados positivos no Grupo D, sendo a recolha de tecido cutâneo um método pouco invasivo e com um impacto praticamente nulo para os animais.

A LCan continua a ser um problema real e urgente de erradicar. No nosso país deveria realizar-se uma monitorização regular a todos os cães, por parte dos proprietários e médicos-veterinários assistentes; uma adoção de medidas de proteção relativamente aos animais infetados; adopção de medidas profiláticas (uso de coleira inseticida, unção puntiforme, domperidona e vacinação) ao maior número de animais possível; adoção de medidas de controlo do vetor; e resguardar os animais de estimação nas horas de maior atividade do vetor.

A contínua sensibilização para este tema é urgente, face à falta de conhecimento demonstrada, especialmente, pelos proprietários dos animais infetados, refletida em alguma incorreta profilaxia dos animais.

Capítulo IV - Bibliografia

- Abda, I.B., Monbrison, F., Bousslimi, N., Aoun, K., Bouratbine, A. & Picot, S. (2011). Advantages and limits of real-time PCR assay and PCR-restriction fragment length polymorphism for the identification of cutaneous *Leishmania* species in Tunisia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 105, pp. 17–22.
- Aboge, G. O., Jia, H., Terkawi, M. A., Goo, Y., Kuriki, K., Nishikawa, Y., Xuan, X. (2007). A novel 57-kDa merozoite protein of *Babesia gibsoni* is a prospective antigen for diagnosis and serosurvey of canine babesiosis by enzyme-linked immunosorbent assay. *Veterinary Parasitology*, 149(1-2), 85–94.
- Abranches, P., Conceição-Silva F. M. & Silva-Pereira M. C. (1984). Kala-azar in Portugal. V. The sylvatic cycle in the enzootic endemic focus of Arrabida. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 87(5), 197-200. Acedido a 7 de abril de 2014, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6530708>
- Abranches P., Silva-Pereira M.C.D., Conceição-Silva F.M., Santos-Gomes G.M., Janz J. G. (1991). Canine Leishmaniasis: Pathological and Ecological Factors Influencing Transmission of Infection. *The Journal of Parasitology*, 77(4), 557–561(5). Acedido a 20 março de 2014, disponível em: <http://www.jstor.org/discover/10.2307/3283159?uid=3738880&uid=2134&uid=2480631387&uid=2&uid=2480631377&uid=70&uid=3&uid=60&sid=21103911954077>
- Abranches, P., Campino, L., & Santos-Gomes, G. M. (1998). Novos conceitos de epidemiologia e imunopatologia e seus reflexos no controlo da leishmaniose. *Acta Médica Portuguesa*, 11, 871–875.
- Adamama-Moraitou, K. K., Rallis, T. S., Koytinas, A. F., Tontis, D., Plevraki, K., & Kritsepi, M. (2007). Asymptomatic colitis in naturally infected dogs with *Leishmania infantum*: a prospective study. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 76(1), 53–7 (resumo online). Acedido a 12 junho de 2014, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17255229>
- Afonso, M. O. & Alves-Pires, C. (2008). Capítulo II: Bioecologia dos vetores. In Santos-Gomes, G.M., Pereira da Fonseca, I.M. (Eds.). *Leishmaniose canina*. (pp. 27-40) Lisboa: Chaves Ferreira – Publicações, S.A.
- Alexander, B., & Maroli, M. (2003). Control of phlebotomine sandflies. *Medical and Veterinary Entomology*, 17(1), 1–18.
- Alexandre-Pires, G. M. & Correia J. J. (2008). Capítulo IV: Patogenia e lesões da leishmaniose canina. In Santos-Gomes, G.M., Pereira da Fonseca, I.M. (Eds.). *Leishmaniose canina*. (pp. 53-68) Lisboa: Chaves Ferreira – Publicações, S.A.
- Alexandre-Pires, G., de Brito, M. T. V., Algueró, C., Martins, C., Rodrigues, O. R., da Fonseca, I. P., & Santos-Gomes, G. (2010). Canine leishmaniasis. Immunophenotypic profile of leukocytes in different compartments of symptomatic, asymptomatic and treated dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 137(3-4), 275–83.
- Almeida, Ã., Mendonça, A., & Sousa, V. (2010). Prevalência e epidemiologia da leishmaniose visceral em cães e humanos , na cidade de Mato Grosso, Brasil. *Ciência Rural*, 40(7), 1610–1615.
- Alvar, J., Cañavate, C., Molina, R., Moreno, J., & Nieto, J. (2004). Canine leishmaniasis. *Advances in Parasitology*, 57(4), 1–88.
- Alves, A. S., Mouta-confort, E., Figueiredo, F. B., Oliveira, R. V. C., Schubach, A. O., & Madeira, M. F. (2012). Evaluation of serological cross-reactivity between canine visceral leishmaniasis and natural infection by *Trypanosoma caninum*. *Research in Veterinary Science*, 93(3), 1329–1333.
- Alves, C. F., de Amorim, I. F. G., Moura, E. P., Ribeiro, R. R., Alves, C. F., Michalick, M. S., Kalapothakis, E., Bruna-Romero, O., Tafuri, W.L., Teixeira, M.M., Melo, M. N. (2009). Expression of

IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and TGF-beta in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 128(4), 349–58.

Amusategui, I., Sainz, A., Rodriguez, F., & Tesouro, M. A. (2003). Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. *European Journal of Epidemiology*, 18, 147–156.

Antoine, J. C., Prina, E., Lang, T., & Courret, N. (1998). The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. *Trends in Microbiology*, 6(10), 392–401.

Armés, S. M. M. C. (2010). Rastreio de *Leishmania infantum* em cães assintomáticos na Região de Mafra. Tese de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa. Disponível em: <http://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/2269/1/Rastreio%20de%20Leishmania%20infantum%20em%20caes%20assintomaticos%20na%20regiao%20de%20Mafra.pdf>

Ashford, R. W. (2000). The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal for Parasitology*, 30(12-13), 1269–81.

Baneth, G. (2010). Proceedings of the 35 th World Small Animal Veterinary Congress. In *Proceedings of the 35th World Small Animal Veterinary Congress WSAVA 2010* (pp. 1–4). Acedido a 23 de março de 2014, disponível em: <http://www.vin.com/Proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2010&PID=56277&O=Generic>

Baneth, G., & Aroch, I. (2008). Canine leishmaniasis: a diagnostic and clinical challenge. *Veterinary Journal (London, England : 1997)*, 175(1), 14–5.

Baneth, G., Koutinas, A. F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P., & Ferrer, L. (2008). Canine leishmaniasis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in Parasitology*, 24(7), 324–30.

Baneth, G., & Shaw, S. E. (2002). Chemotherapy of canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 106(4), 315–24.

Barbiéri, C. L. (2006). Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunology*, 28(7), 329–37.

Baneth G., Solano-Gallego L. (2013). Section IV: Protozoal Diseases. Chapter 73: Leishmaniasis. In *Infectious Diseases of the dog and cat* (4th ed.). (pp. 734 – 752). St. Louis, Missouri USA: Saunders Elsevier.

Barbosa, S. D. N. (2011). A Leishmaniose canina e os condicionalismos determinados pelas respectivas alterações renais. Tese de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa. Disponível em: <https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/3548/1/A%20Leishmaniose%20canina%20e%20os%20condicionalismos%20determinados%20pelas%20respectivas%20altera%C3%A7oes%20renais.pdf>

Bayer Animal Health (2014). Parasites. Sand Flies. Acedido a 8 de abril de 2014, disponível em: <http://www.animalhealth.bayer.com/4718.0.html>

Bayer Saúde Animal (2014). Animais de Companhia. Flebotomos. Acedido a 8 de abril de 2014, disponível em: http://www.bayervet.com.pt/pt/animais_companhia/flebotomos/

Birnbaum, R., & Craft, N. (2011). Innate immunity and *Leishmania* vaccination strategies. *Dermatologic Clinics*, 29(1), 89–102.

Boarino, A., Scalone, A., Gradoni, L., Ferroglio, E., Vitale, F., Zanatta, R., Giuffrida, M.G., & Rosati, S. (2005). Development of Recombinant Chimeric Antigen Expressing Immunodominant B Epitopes of

- Leishmania infantum* for Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis. *Clinical and Vaccine Immunology*, 12(5), 647-653.
- Boarino, A., Bollo, E., Prunotto, L., Canale, L., Uslenghi, F., & Poletti, P. (2008). Application of a recombinant protein for the serological diagnosis of canine leishmaniasis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 31(6), 527-36.
- Bongiorno, G., Habluetzel, a., Khoury, C., & Maroli, M. (2003). Host preferences of phlebotomine sand flies at a hypoendemic focus of canine leishmaniasis in central Italy. *Acta Tropica*, 88(2), 109-116.
- Bongiorno, G., Paparcone, R., Manzillo, V.F., Oliva, G., Cuisinier, A., & Gradoni, L. (2013). Vaccination with LiESP/QA-21 (CaniLeish®) reduces the intensity of infection in *Phlebotomus perniciosus* fed on *Leishmania infantum* infected dogs--a preliminary xenodiagnosis study. *Veterinary Parasitology*, 197 (3-4), 691-695.
- Bremer, W. G., Schaefer, J. J., Wagner, E. R., Ewing, S. a, Rikihisa, Y., Needham, G. R., Jittapalpong, S., Moore D. L., Stich, R. W. (2005). Transstadial and intrastadial experimental transmission of *Ehrlichia canis* by male *Rhipicephalus sanguineus*. *Veterinary Parasitology*, 131(1-2), 95-105.
- Brito, F. L. C., Alves, L. C., Maia, F. C. L., Santos, E. S. C., Laus, J. L., & Meunier, I. M. J. (2006). Ocular alterations in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária E Zootecnia*, 58(5), 768-775.
- Cabral, M., O'Grady, J., & Alexander, J. (1992). Demonstration of *Leishmania* specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. *Parasite Immunology*, 14(5), 531-539.
- Cabral, M., O'Grady, J. E., Gomes, S., Sousa, J. C., Thompson, H., & Alexander, J. (1998). The immunology of canine leishmaniosis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. *Veterinary Parasitology*, 76(3), 173-80.
- Caeiros, A.P.S. (2012). Detecção de *Babesia* spp. e de outros hemoparasitas em cães, por técnicas morfológicas, serológicas e moleculares, no distrito de Lisboa, Portugal. Tese de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa. Disponível em: <https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/4991/1/Detec%C3%A7%C3%A3o%20de%20Babesia%20spp.%20e%20de%20outros%20hemoparasitas%20em%20c%C3%A3es,%20por%20t%C3%A9cnicas%20morfol%C3%B3gicas,%20serol%C3%B3gicas%20e%20moleculares,%20no%20distrito%20de%20Lisboa,%20Portugal.pdf>
- Campino, L. M. (2002). Canine Reservoirs and Leishmaniasis: Epidemiology and Disease . In *World Class Parasites* (pp. 45-57).
- Campino, L., & Maia, C. (2010). Epidemiologia das leishmanioses em portugal. *Acta Médica Portuguesa*, 23, 859-864.
- Campino, L., Pratlong, F., Abranches, P., Rioux, J., Santos-Gomes, G., Alves-Pires, C., Cortes, S., Ramada, J., Cristovão, J. M., Afonso, M. O. & Dedet, J. P. (2006). Leishmaniasis in Portugal: enzyme polymorphism of *Leishmania infantum* based on the identification of 213 strains. *Tropical Medicine & International Health: TM & IH*, 11(11), 1708-14.
- Canine Vector-Born Diseases (CVBD) (2014). Clinical sessions - Leishmaniosis. Acedido a 12 maio de 2014, disponível em: <http://www.cvbd.org/en/clinical-sessions/leishmaniosis/>
- Cardoso, L., Neto, F., Sousa, J. C., Rodrigues, M., & Cabral, M. (1998). Use of a leishmanin skin test in the detection of canine *Leishmania*-specific cellular immunity. *Veterinary Parasitology*, 79(3), 213-20.

- Cardoso, L., Santos, H., Cordeiro-da-silva, A., Pratlong, F., & Dedet, J. (2002). *Leishmania infantum* MON-98 : infection in a dog from Alto Douro , Portugal. *Acta Tropica*, 83(1), 83–85.
- Cardoso, L., Schallig, H. D. F. H., Neto, F., Kroon, N., & Rodrigues, M. (2004). Serological survey of *Leishmania* infection in dogs from the municipality of Peso da Régua (Alto Douro, Portugal) using the direct agglutination test (DAT) and fast agglutination screening test (FAST). *Acta Tropica*, 91(2), 95–100.
- Castagnaro, M., Crotti, A., A, F., Gradoni, L., Lubas, G., Maroli, M., et al. (2007). *Canine leishmaniasis: guidelines for diagnosis, staging, therapy, monitoring and prevention. Part I: Diagnostic approach and classification of the patient affected by leishmaniasis and management of dogs with proteinuria* (pp. 1–19).
- Chance, M. L. (1981). The Six Diseases of WHO. *British Medical Journal*, 283, (7 November), 1245–1247.
- Chatterjee, M., Baneth, G., Jaffe, C. L., Sharma, V., & Mandal, C. (1999). Diagnostic and prognostic potential of antibodies against O-acetylated sialic acids in canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 70(1-2), 55–65.
- Ciaramella, P., Oliva, G., Luna, R. De, Gradoni, L., Ambrosio, R., Cortese, L., Scalone A., & Persechino, A. (1997). A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *The Veterinary Record*, 141(21), 539–543.
- Coelho, W. M. D., Lima, V. M. F. De, Amarante, A. F. T. Do, Langoni, H., Pereira, V. B. R., Abdelnour, A., & Bresciani, K. D. S. (2010). Occurrence of *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) in Andradina, São Paulo, Brazil: case report. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária = Brazilian Journal of Veterinary Parasitology: Órgão Oficial Do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária*, 19(4), 256–8. Retrieved from
- Cortadellas, O. (2003). Initial and long-term efficacy of a lipid emulsion of amphotericin B desoxycholate in the management of canine leishmaniasis. *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 17(6), 808–12.
- Cortes, S., Mauricio, I., Almeida, A., Cristovão, J. M., Pratlong, F., Dedet, J. P., & Campino, L. (2006). Application of kDNA as a molecular marker to analyse *Leishmania infantum* diversity in Portugal. *Parasitology International*, 55(4), 277–83.
- Cortes, S., Vaz, Y., Neves, R., Maia, C., Cardoso, L., & Campino, L. (2012). Risk factors for canine leishmaniasis in an endemic Mediterranean region. *Veterinary Parasitology*, 189(2-4), 189–96.
- Cox, F. E. G. (2002). History of Human Parasitology, 15(4), 595–612.
- Cross, E. R., & Hyams, K. C. (1996). The Potential Effect of Global Warming. *Environmental Health Perspectives*, 104(7), 724–727.
- Cruz, I., Morales, M. A., Noguer, I., Rodriguez, A., & Alvar, J. (2002). *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users. *The Lancet*, 359(9312), 1124–1125.
- Cupolillo, E., Medina-Acosta, E., Noyes, H., Momen, H., & Grimaldi, G. (2000). A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitology Today (Personal Ed.)*, 16(4), 142–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10725899>
- Canine Vector Borne Diseases (CVBD). Acedido a 27 de março de 2014, disponível em <http://www.cvbd.org/en/sand-fly-borne-diseases/about-sand-flies/general-aspects/taxonomy/>
- Da Silva, I. P. C. (2011). Estudo de hemoparasitas transmitidos por vectores, em cães de canil, Setúbal, Portugal. Tese de Mestrado Integradado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa. Disponível em:

<http://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/3543/1/Estudo%20de%20hemoparasitas%20transmitidos%20por%20vetores%2c%20em%20caes%20de%20canil.pdf>

Da Silva, E. S., van der Meide, W. F., Schoone, G. J., Gontijo, C. M. F., Schallig, H. D. F. H., & Brazil, R. P. (2006). Diagnosis of canine leishmaniasis in the endemic area of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil by parasite, antibody and DNA detection assays. *Veterinary Research Communications*, 30(6), 637–43.

Daneshvar, H., Mahmmodi, Z., Kamiabi, H., Phillips, R.S. & Burchmore (2014). Dogs vaccinated with gentamicin-attenuated *Leishmania infantum* or infected with wild-type parasite can be distinguished by Western blotting. *Parasite Immunology*, 36 (5), 218-224.

Dantas-Torres, F. (2007). The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Veterinary Parasitology*, 149(3-4), 139–46.

Dantas-Torres, F., & Brandão-Filho, S. P. (2006). Visceral leishmaniasis in Brazil: Revisiting paradigms of epidemiology and control. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 48(3), 151–156.

Dantas-Torres, F., de Brito, M. E. F., & Brandão-Filho, S. P. (2006). Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. *Veterinary Parasitology*, 140(1-2), 54–60.

Day, M. J. (2007). Immunoglobulin G subclass distribution in canine leishmaniasis: a review and analysis of pitfalls in interpretation. *Veterinary Parasitology*, 147(1-2), 2–8.

De Andrade, H. M., Reis, A. B., dos Santos, S. L., Volpini, A. C., Marques, M. J., & Romanha, A. J. (2006). Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. *Veterinary Parasitology*, 140(3-4), 231–8.

De Castro, M. B., Machado, R. Z., de Aquino, L. P. C. T., Alessi, A. C., & Costa, M. T. (2004). Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. *Veterinary Parasitology*, 119(1), 73–86.

De Freitas, E., Melo, M. N., da Costa-Val, A. P., & Michalick, M. S. M. (2006). Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: potential for infection and importance of clinical factors. *Veterinary Parasitology*, 137(1-2), 159–67.

De Lima, V. M. F., Fattori, K. R., Michelin, A. D. F., da Silveira Neto, L., & Vasconcelos, R. D. O. (2010). Comparison between ELISA using total antigen and immunochromatography with antigen rK39 in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 173(3-4), 330–3.

De Paiva Cavalcanti, M., Felinto de Brito, M. E., de Souza, W. V., de Miranda Gomes, Y., & Abath, F. G. C. (2009). The development of a real-time PCR assay for the quantification of *Leishmania infantum* DNA in canine blood. *Veterinary Journal (London, England : 1997)*, 182(2), 356–8.

Deplazes, P., Smith, N. C., Arnold, P., Lutz, H., & Eckert, J. (1995). Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. *Parasite Immunology*, 17(9), 451–458.

Desjeux, P. (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 27(5), 305–18.

Dhanasekaran, S., Doherty, T. M., & Kenneth, J. (2010). Comparison of different standards for real-time PCR-based absolute quantification. *Journal of Immunological Methods*, 354(1-2), 34–9.

Dos Santos, J. P. G. A. B. (2014). Estudo observacional transversal de parasitas em cães errantes no Concelho de Vila Franca de Xira, Portugal. Tese de Mestrado Integradado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa. Disponível em: <http://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/6884/1/Estudo%20Observacional%20Transversal%20d>

e%20Parasitas%20em%20Animais%20Errantes%20no%20Concelho%20de%20Vila%20Franca%20de%20Xira%20c%20Portugal.pdf

ESTEVE on-line (2014). Acedido a 10 de março de 2014, disponível em: http://www.esteve.pt/EsteveFront/CargarPagina.do?pagina=vet_leispro_quees.jsp&div=vet

Fernández-Bellón, H., Solano-Gallego, L., Rodríguez, A., Rutten, V. P. M. G., Hoek, A., Ramis, A., Alberola, J. & Ferrer, L. (2005). Comparison of three assays for the evaluation of specific cellular immunity to *Leishmania infantum* in dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 107(1-2), 163–9.

Fernández-Pérez, F. J., Méndez, S., de la Fuente, C., Gómez-Muñoz, M. T., Cuquerella, M., & Alunda, J. M. (1999). Short report: improved diagnosis and follow-up of canine leishmaniasis using amastigote-based indirect immunofluorescence. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 61(4), 652–3.

Ferreira, E. D. C., de Lana, M., Carneiro, M., Reis, A. B., Paes, D. V., da Silva, E. S., Schallig, H. & Gontijo, C. M. F. (2007). Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Veterinary Parasitology*, 146(3-4), 235–41.

Ferreira, S. D. A., Ituassu, L. T., de Melo, M. N., & de Andrade, A. S. R. (2008). Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 152(3-4), 257–63.

Ferroglio, E., & Vitale, F. (2006). Diagnosis of Leishmaniosis: Between Old Doubts and New Uncertainties. *Veterinary Research Communications*, 30(S1), 35–38.

Ferroglio, E., Centaro, E., Mignone, W., & Trisciuglio, a. (2007). Evaluation of an ELISA rapid device for the serological diagnosis of *Leishmania infantum* infection in dog as compared with immunofluorescence assay and Western blot. *Veterinary Parasitology*, 144(1-2), 162–6.

Figueiredo, T.C.D. (2007) *Estudo da Prevalência de Doenças Associadas a Vetores em Canídeos Domésticos do Distrito de Bragança*. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Clínica. Lisboa: Faculdade de Medicina de Lisboa – Universidade de Lisboa.

Figueiredo, M. J. D. F. M. De, Souza, N. F. De, Figueiredo, H. F. De, Meneses, A. M. C., Filho, E. D. S., & Nascimento, G. G. (2014). Fatores De Risco E Classificação Clínica Associados À Soropositividade Para Leishmaniose Visceral Canina. *Ciência Animal Brasileira*, 15(1), 102–106.

Foglia Manzillo, V., Paparcone, R., Cappiello, S., De Santo, R., Bianciardi, P., & Oliva, G. (2009). Resolution of tongue lesions caused by *Leishmania infantum* in a dog treated with the association miltefosine-allopurinol. *Parasites & Vectors*, 2 (S1), S6.

França-Silva, J. C., da Costa, R. T., Siqueira, A. M., Machado-Coelho, G. L. L., da Costa, C. A., Mayrink, W., Vieira, E. P., Costa, J. S., Genaro, O. & Nascimento, E. (2003). Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 111(2-3), 161–73.

Francino, O., Altet, L., Sánchez-Robert, E., Rodríguez, a, Solano-Gallego, L., Alberola, J., Ferrer, L., Sánchez, A. & Roura, X. (2006). Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 137(3-4), 214–21.

Gállego, M. (2004). Zoonosis emergentes por patógenos parásitos: las leishmaniosis Introducción Agente etiológico y clasificación Historia Importancia para la salud pública y la sanidad animal, 23(2), 661–676.

Gálvez, R., Miró, G., Descalzo, M. A, Nieto, J., Dado, D., Martín, O., Molina, R. (2010). Emerging trends in the seroprevalence of canine leishmaniasis in the Madrid region (central Spain). *Veterinary Parasitology*, 169(3-4), 327–34.

- Gan, S. D., & Patel, K. R. (2013). Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *The Journal of Investigative Dermatology*, 133(9), e12.
- Garrido, J.M.C. B. G. (2012). Contribuição para o estudo da prevalência da infecção por *Leishmania infantum* em gatos domésticos e errantes nos distritos de Lisboa e Viseu. Tese de Mestrado Integradado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa. Disponível em: <https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/4948/1/Joana%20Garrido%20Tese.pdf>
- Gluezn, E., Ginger, M. L., & McKean, P. G. (2010). Flagellum assembly and function during the *Leishmania* life cycle. *Current Opinion in Microbiology*, 13(4), 473–9.
- Gomes, A. H. S., Ferreira, I. M. R., Lima, M. L. S. R., Cunha, E. a, Garcia, A. S., Araújo, M. F. L., & Pereira-Chiocola, V. L. (2007). PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine Leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 144(3-4), 234–41. doi:10.1016/j.vetpar.2006.10.008
- Gomes, Y. M., Paiva Cavalcanti, M., Lira, R. a, Abath, F. G. C., & Alves, L. C. (2008). Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *Veterinary Journal (London, England: 1997)*, 175(1), 45–52.
- Goo, Y.-K., Jia, H., Aboge, G. O., Terkawi, M. A., Kuriki, K., Nakamura, C., et al.. (2008). Babesia gibsoni: Serodiagnosis of infection in dogs by an enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant BgTRAP. *Experimental Parasitology*, 118(4), 555–60.
- Gramiccia, M. (2011). Recent advances in leishmaniosis in pet animals: epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. *Veterinary Parasitology*, 181(1), 23–30.
- Gramiccia, M., & Gradoni, L. (2005). The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *International Journal for Parasitology*, 35(11-12), 1169–80.
- Gramiccia, M., & Gradoni, L. (2007). Chapter V: The leishmaniasis of Southern Europe. In *Emerging Pests and Vector-borne Diseases in Europe*. Acedido em 4 de abril de 2014, disponível em: http://www.google.pt/books?hl=pt-PT&lr=&id=BEs_2o58GskC&oi=fnd&pg=PA75&dq=The+leishmaniasis+of+Southern+Europe&ots=yuqSGx2MDp&sig=apfy_5tcUmvjEs7_6Jz_wHV0xc&redir_esc=y#v=onepage&q=The%20leishmaniasis%20of%20Southern%20Europe&f=false
- Greene, C.E. (2013). Section IV: Protozoal Diseases. Chapter 73: Leishmaniasis. In *Infectious Diseases of the dog and cat (4th ed.)*. (pp. 734 – 752). St. Louis, Missouri USA: Saunders Elsevier.
- Greene, C.E., Hidd, L. & Breitschwerdt (2013). Section I: Viral, Rickettsial, and Chlamydial Diseases. Chapter 27: Rocky Mountains and Mediterranean Spotted Fevers. In *Infectious Diseases of the dog and cat (4th ed.)*. (pp. 734 – 752). St. Louis, Missouri USA: Saunders Elsevier.
- Helhazar, M., Leitão, J., Duarte, A., Tavares, L., & Pereira da Fonseca, I. P. (2013). Natural infection of synanthropic rodent species *Mus musculus* and *Rattus norvegicus* by *Leishmania infantum* in Sesimbra and Sintra--Portugal. *Parasites & Vectors*, 6(88), 1–12.
- Holman, R. C., Paddock, C. D., Curns, a T., Krebs, J. W., McQuiston, J. H., & Childs, J. E. (2001). Analysis of risk factors for fatal Rocky Mountain Spotted Fever: evidence for superiority of tetracyclines for therapy. *The Journal of Infectious Diseases*, 184(11), 1437–44.
- Iniesta, L., Gállego, M., & Portús, M. (2005). Immunoglobulin G and E responses in various stages of canine leishmaniosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 103(1-2), 77–81.
- International Renal Interest Society (IRIS) (2013). IRIS Staging of CKD. Acedido a 14 julho de 2014, disponível em: <http://www.iris-kidney.com/guidelines/staging.shtml>.

- Irwin, P. J. (2009). Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control. *Parasites & Vectors*, 2(1), 1–9.
- João, A., Pereira, M. A., Cortes, S., & Santos-Gomes, G. M. (2006). Canine Leishmaniasis Chemotherapy: Dog's Clinical Condition and Risk of Leishmania Transmission. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 53(10), 540–545.
- Killick-Kendrick, R. (1990). Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Medical and Veterinary Entomology*, 4(1), 1–24.
- Komnenou, A. a, Mylonakis, M. E., Kouti, V., Tendoma, L., Leontides, L., Skountzou, et al. (2007). Ocular manifestations of natural canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a retrospective study of 90 cases. *Veterinary Ophthalmology*, 10(3), 137–42.
- Lamothe, J. (2001). Activity of amphotericin B in lipid emulsion in the initial treatment of canine leishmaniasis. *The Journal of Small Animal Practice*, 42(4), 170–5.
- Léger, N., & Depaquit, J. (2001). Les phlébotomes et leur rôle dans la transmission des leishmanioses. *Ectoparasites et vecteurs d'intérêt médical. Revue Française des Laboratoires*, 338.
- Levin, M. L., Killmaster, L. F., & Zemtsova, G. E. (2012). Domestic dogs (*Canis familiaris*) as reservoir hosts for *Rickettsia conorii*. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*, 12(1), 28–33.
- Liquid Jigsaw (2014). Acedido a 7 de maio de 2014, disponível em: <http://www.liquidjigsaw.com/science/illustration/index.html>
- Livre de Parasitas (2014). Parasitas externos. Flebotomos. Acedido em 29 de março de 2014, disponível em: <http://www.livredeparasitas.com/pt/parasitas-externos/tudo-sobre-parasitas-externos/flebotomos/>
- Lira, R. a, Cavalcanti, M. P., Nakazawa, M., Ferreira, a G. P., Silva, E. D., Abath, F. G. C., Gomes, Y. M. (2006). Canine visceral leishmaniosis: a comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. *Veterinary Parasitology*, 137(1-2), 11–6.
- Maia, C., & Campino, L. (2008). Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Veterinary Parasitology*, 158(4), 274–87.
- Maia, C., & Campino, L. (2011). Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis? *Trends in Parasitology*, 27(8), 341–4.
- Maia, C., Dionísio, L., Afonso, M. O., Neto, L., Cristóvão, J. M., & Campino, L. (2013). Leishmania infection and host-blood feeding preferences of phlebotomine sandflies and canine leishmaniasis in an endemic European area, the Algarve Region in Portugal. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 108(June), 481–487.
- Maia, C., Gomes, J., Cristóvão, J., Nunes, M., Martins, a, Rebêlo, E., & Campino, L. (2010). Feline Leishmania infection in a canine leishmaniasis endemic region, Portugal. *Veterinary Parasitology*, 174(3-4), 336–40.
- Maia, C., Ramada, J., Cristóvão, J. M., Gonçalves, L., & Campino, L. (2009). Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. *Veterinary Journal (London, England: 1997)*, 179(1), 142–4.
- Mancianti F. (2004). Feline leishmaniasis: what's the epidemiological role of the cat? (resumo online). Acedido a 16 de abril de 2014, disponível em: <http://europepmc.org/abstract/MED/15305717>

- Mancianti, F., Falcone, M. L., Giannelli, C., & Poli, A. (1995). Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 59(1), 13–21.
- Manna, L., Reale, S., Picillo, E., Vitale, F., & Gravino, A. E. (2008). Urine Sampling for Real-Time Polymerase Chain Reaction-Based Diagnosis of Canine Leishmaniasis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20(1), 64–67.
- Manna, L., Reale, S., Viola, E., Vitale, F., Foglia Manzillo, V., Pavone, L. M., Gravino, A. E. (2006). *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. *Veterinary Parasitology*, 142(3-4), 271–80.
- Manna, L., Reale, S., Vitale, F., & Gravino, A. E. (2009). Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. *Research in Veterinary Science*, 87(1), 76–8.
- Manna, L., Reale, S., Vitale, F., Picillo, E., Pavone, L. M., & Gravino, A. E. (2008). Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *Veterinary Journal (London, England : 1997)*, 177(2), 279–82.
- Maroli, M., Feliciangeli, M. D., Bichaud, L., Charrel, R. N., & Gradoni, L. (2013). Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and Veterinary Entomology*, 27(2), 123–47.
- Maroli, M., Gradoni, L., Oliva, G., Castagnaro, M., Crotti, A., Lubas, G., Zatelli, A. (2010). Guidelines for prevention of leishmaniasis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 236(11), 1200–6.
- Marques, M. I. L. M. (2008). Leishmaniose Canina. Tese de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa. disponível em: <http://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/950/1/Leishmaniose%20canina.pdf>
- Martínez, V., Quilez, J., Sanchez, A., Roura, X., Francino, O., & Altet, L. (2011). Canine leishmaniasis: the key points for qPCR result interpretation. *Parasites & Vectors*, 4(57), 1–5.
- Martínez-Moreno, A., Moreno, T., Martínez-Moreno, F. J., Acosta, I., & Hernández, S. (1995). Humoral and cell-mediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 48(3-4), 209–20.
- Martínez-Subiela, S., García-Martínez, J. D., Tvarijonaviciute, A., Tecles, F., Caldin, M., Bernal, L. J., & Cerón, J. J. (2013). Urinary C reactive protein levels in dogs with leishmaniasis at different stages of renal damage. *Research in Veterinary Science*, 95(3), 924–9.
- Mary, C., Faraut, F., Lascombe, L., & Dumon, H. (2004). Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a Real-Time PCR Assay with High Sensitivity. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(11), 5249–5255.
- Masucci, M., De Majo, M., Contarino, R. B., Borruto, G., Vitale, F., & Pennisi, M. G. (2003). Canine leishmaniasis in the newborn puppy. *Veterinary Research Communications*, 27(1), 771–4.
- Meireles, J. A. F. S. (2008). Capítulo VII: Terapêutica e Profilaxia da Leishmaniose canina. In Santos-Gomes, G.M., Fonseca, I.M.P. (Eds.). *Leishmaniose canina*. (pp. 93-104) Lisboa: Chaves Ferreira – Publicações, S.A.
- Melo, M. N., & Gontijo. (2004). Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual , desafios e perspectivas Visceral Leishmaniasis in Brazil : *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 7(3), 338–349.
- Meredith, S. E., Kroon, N. C., Sondorp, E., Seaman, J., Goris, M. G., van Ingen, C. W., Oskam, L. (1995). Leish-KIT , a stable direct agglutination test based on freeze-dried antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis . *Journal of Clinical Microbiology*, 33(7), 1742–1745.

- Mettler, M., Grimm, F., Capelli, G., Camp, H., & Deplazes, P. (2005). Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays , an Immunofluorescent-Antibody Test , and Two Rapid Tests (Immunochromatographic-Dipstick and Gel Tests) for Serological Diagnosis of Symptomatic and Asymptomatic *Leishmania* Infections in Dogs Evaluation. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(11), 5515–5519.
- Miranda, S., Roura, X., Picado, A., Ferrer, L., & Ramis, A. (2008). Characterization of sex, age, and breed for a population of canine leishmaniosis diseased dogs. *Research in Veterinary Science*, 85(1), 35–8.
- Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Oliva, G., & Baneth, G. (2008). Canine leishmaniosis--new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends in Parasitology*, 24(8), 371–7.
- Miró, G., Gálvez, R., Mateo, M., Montoya, A., Descalzo, M. A., & Molina, R. (2007). Evaluation of the efficacy of a topically administered combination of imidacloprid and permethrin against *Phlebotomus perniciosus* in dog. *Veterinary Parasitology*, 143(3-4), 375–9. doi:10.1016/j.vetpar.2006.09.014
- Moita, M. S. M. (2012). Estudo retrospectivo das doenças transmitidas por vectores - Babesiose, Ehrlichiose, Rickettsiose e Leishmaniose - em cães do Concelho de Cascais. Tese de Mestrado Integrado. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.
- Molina, R., Amelia, C., Nieto, J., San-Andres, M., Gonzalez, F., Castillo, J. A., et al. (1994). Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus* (resumo online). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(4), 491–493. Acedido em 12 de abril de 2014, disponível em: <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=4202156>
- Molina, R., Miró, G., Gálvez, R., Nieto, J., & Descalzo, M. A. (2006). Evaluation of a spray of permethrin and pyriproxyfen for the protection of dogs against *Phlebotomus perniciosus* (resumo online). *The Veterinary Record*, 159(7), 206–9. Acedido em 13 de julho de 2014, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16905734>
- Molina, R., Espinosa-Góngora, C., Gálvez, R., Montoya, A., Descalzo, M. A., Jiménez, M. I., Miró, G. (2012). Efficacy of 65% permethrin applied to dogs as a spot-on against *Phlebotomus perniciosus*. *Veterinary Parasitology*, 187(3-4), 529–33.
- Momen, H., & Cupolillo, E. (2000). Speculations on the origin and evolution of the genus *Leishmania*. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 95(4), 583–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10904419>
- Moreira, M. a B., Luvizotto, M. C. R., Garcia, J. F., Corbett, C. E. P., & Laurenti, M. D. (2007). Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Veterinary Parasitology*, 145(3-4), 245–52.
- Moreno, J., & Alvar, J. (2002). Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends in Parasitology*, 18(9), 399–405.
- Morillas-Marquez, F., Martin-Sanchez, J., Acedo-Sanchez, C., Pineda, J. A., Macias, J., & Sanjuan-Garcia, J. (2002). *Leishmania infantum* (Protozoa, kinetoplastida): transmission from infected patients to experimental animal under conditions that simulate needle-sharing. *Experimental Parasitology*, 100(1), 71–4. doi:10.1006/expr.2001.4678
- Mortarino, M., Franceschi, A., Mancianti, F., Bazzocchi, C., Genchi, C., & Bandi, C. (2004). Quantitative PCR in the diagnosis of *Leishmania* (resumo online). *Parassitologia*, 46(1-2), 163–7. Acedido a 29 agosto de 2014, disponível em: <http://europepmc.org/abstract/MED/15305709>
- Murray, H. W., Berman, J. D., Davies, C. R., & Saravia, N. G. (2005). Advances in leishmaniasis. *Lancet*, 366(9496), 1561–1577.

- Neer, T. M., Breitschwerdt, E. B., Greene, R. T., & Lappin, M. R. (2002). Consensus Statement on Ehrlichial Disease of Small Animals from the Infectious Disease Study Group of the ACVIM. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 16(3), 309–315.
- Oliva, G., Gradoni, L., Ciaramella, P., Luna, R. De, Cortese, L., Orsini, S., Persechino, A. (1995). Activity of liposomal amphotericin B (AmBisome) in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 36(6), 1013–1019.
- Oliva, G., Roura, X., Crotti, A., Maroli, M., Castagnaro, M., Gradoni, L., Zini, E. (2010). Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 236(11), 1192–8.
- Oliveira, G. G., Santoro, F., & Sadigursky, M. (1993). The subclinical form of experimental visceral leishmaniasis in dogs. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 88(2), 243–8.
- Oliveira, L. S., Julião, F. S., Mendes de Souza, V. M., Souza, D., Souza, B. M., Paule, B. J. A., et al. (2005). A utilização da Imunofluorescência Indirecta no diagnóstico de rotina da Leishmaniose Visceral Canina e suas Implicações. *Ciência Animal Brasileira*, 6(1), 41–47.
- Otranto, D., Paradies, P., de Caprariis, D., Stanneck, D., Testini, G., Grimm, F., Capelli, G. (2009). Toward diagnosing *Leishmania infantum* infection in asymptomatic dogs in an area where leishmaniasis is endemic. *Clinical and Vaccine Immunology*, 16(3), 337–43.
- Otranto, D., Dantas-Torres, F., de Caprariis, D., Di Paola, G., Tarallo, V. D., Latrofa, M. S., Stanneck, D. (2013). Prevention of canine leishmaniosis in a hyper-endemic area using a combination of 10% imidacloprid/4.5% flumethrin. *PloS One*, 8(2), e56374.
- Owens, S. D., Oakley, D. A., Marryott, K., Hatchett, W., Walton, R., Nolan, T. J., et al. (2001). Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs (resumo online). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 219(8), 1076–83. Acedido a 3 de maio de 2014, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11700704>
- Oyamada, M., Davoust, B., Boni, M., Dereure, J., Bucheton, B., & Hammad, A. (2005). Detection of *Babesia canis rossi*, *B. canis vogeli*, and *Hepatozoon canis* in Dogs in a Village of Eastern Sudan by Using a Screening PCR and Sequencing Methodologies in Dogs in a Village of Eastern Sudan by Using a Screening PCR and Sequencing Methodolog. *Clinical and Vaccine Immunology*, 12(11), 1343–1346.
- Paiva-Cavalcanti, M., Regis-da-silva, C., & Gomes, Y. (2010). Comparison of real-time PCR and conventional PCR for detection of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* infection : a mini-review. *The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 16(4), 537–542.
- Palatnik-de-Sousa, C. B. (2012). Vaccines for canine leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*, 3(April), 69.
- Paltrinieri, S., Solano-gallego, L., Fondati, A., Lubas, G., Gradoni, L., Castagnaro, M., Zini, E. (2010). Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *Veterinary Medicine Today: Reference Point*, 236(11), 1184–1191.
- Panciera, R. J., Ewing, S. a., & Confer, a. W. (2001). Ocular Histopathology of Ehrlichial Infections in the Dog. *Veterinary Pathology*, 38(1), 43–46.
- Parola, P., Paddock, C. D., & Raoult, D. (2005). Tick-Borne Rickettsioses around the World : Emerging Diseases Challenging Old Concepts. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4).
- Parola, P., & Raoult, D. (2001). Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 32(6), 897–928.

Paulan, S. D. C., Lins, A. G. D. S., Tenório, M. D. S., Silva, D. T. Da, Pena, H. F. D. J., Machado, R. Z., Buzetti, W. A. S. (2013). Seroprevalence rates of antibodies against *Leishmania infantum* and other protozoan and rickettsial parasites in dogs. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 22(1), 162–6.

Peña, M. T., Roura, X., & Davidson, M. G. (2000). Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dogs: 105 cases (1993-1998). *Veterinary Ophthalmology*, 3(1), 35–41.

Pereira, M. A. M. (2008). Capítulo III: Epidemiologia da leishmaniose canina. In Santos-Gomes, G.M., Pereira de Fonseca, I.M. (Eds.). *Leishmaniose canina*. (pp. 27-40) Lisboa: Chaves Ferreira – Publicações, S.A.

Pereira da Fonseca, I. M. & Santos-Gomes, G. M. (2008). Capítulo VIII: Perspetivas futuras. In Santos-Gomes, G.M., Pereira da Fonseca, I.M. (Eds.). *Leishmaniose canina*. (pp. 83-92) Lisboa: Chaves Ferreira – Publicações, S.A.

Pereira da Fonseca, I. M. & Villa de Brito, M. T. (2008). Capítulo VI: Diagnóstico. In Santos-Gomes, G.M., Pereira da Fonseca, I.M. (Eds.). *Leishmaniose canina*. (pp. 83-92) Lisboa: Chaves Ferreira – Publicações, S.A.

Petanides, T. A., Koutinas, A. F., Mylonakis, M. E., Day, M. J., Saridomichelakis, M. N., Leontides, L. S., Lekkas, S. (2008). Factors associated with the occurrence of epistaxis in natural canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 22(4), 866–72.

Petersen, C. A. (2010). Leishmaniasis, An Emerging Disease Found in Companion Animals in the United States. *Top Companion Animal Medicine*., 24(4), 182–188.

Petersen, C. A., & Barr, S. C. (2010). Canine Leishmaniasis in North America: Emerging or Newly Recognized?, 39(6), 1–11.

Pinelli, E., Wagenaar, J., Bernadina, W., Pinelli, E., Killick-Kendrick, R., Wagenaar, J., et al. (1994). Cellular and Humoral Immune Responses in Dogs Experimentally and Naturally Infected with *Leishmania infantum*. *Infection and Immunity*, 62(1), 229–235(7).

Porrozzzi, R., Santos da Costa, M. V, Teva, A., Falqueto, A., Ferreira, A. L., dos Santos, C. D., Grimaldi, G. (2007). Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. *Clinical and Vaccine Immunology : CVI*, 14(5), 544–8.

Quinnell, R. J., & Courtenay, O. (2009). Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology*, 136(14), 1915–34.

Rallis, T., Day, M. J., Saridomichelakis, M. N., Adamama-Moraitou, K. K., Papazoglou, L., Fytianou, a, & Koutinas, a F. (2005). Chronic hepatitis associated with canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*): a clinicopathological study of 26 cases. *Journal of Comparative Pathology*, 132(2-3), 145–52.

Real-Time PCR Research and Diagnostic Core Facility. (2011). *Real-Time PCR Core Facility Quality Assurance / Quality Control Guidance for Real-time PCR Analysis*.

Reis, A. B., Teixeira-Carvalho, a, Giunchetti, R. C., Guerra, L. L., Carvalho, M. G., Mayrink, W., Martins-Filho, O. a. (2006). Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Clinical and Experimental Immunology*, 146(2), 303–11.

Reis, A. B., Teixeira-Carvalho, A., Vale, A. M., Marques, M. J., Giunchetti, R. C., Mayrink, W., Martins-Filho, O. a. (2006). Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue

- parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 112(3-4), 102–16.
- Reis, L. E. S., Coura-Vital, W., Roatt, B. M., Bouillet, L. É. M., Ker, H. G., Fortes de Brito, R. C., Reis, A. B. (2013). Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: a comparative study of three methods using skin and spleen from dogs with natural *Leishmania infantum* infection. *Veterinary Parasitology*, 197(3-4), 498–503.
- Reisinho, A.T.S.C. (2010). Atualização da prevalência de Leishmaniose Canina nos Concelhos de Setúbal e Palmela. Tese de Mestrado em Parasitologia Médica. Lisboa: Instituto de Higiene e Medicina Tropical - Universidade Nova de Lisboa.
- Rhalem, A., Sahibi, H., Lasri, S., & Jaffe, C. L. (1999). Analysis of immune responses in dogs with canine visceral leishmaniasis before, and after, drug treatment. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 71(1), 69–76.
- Rikihisa, Y., Ewing, S. A., Fox, J. C., Siregar, A. G., Pasaribu, F. H., & Malole, M. B. (1992). Analyses of *Ehrlichia canis* and a canine granulocytic Ehrlichia infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(1), 143–8.
- Rodríguez-Cortés, A., Fernández-Bellón, H., Ramis, A., Ferrer, L., Alberola, J., & Solano-Gallego, L. (2007). *Leishmania*-specific isotype levels and their relationship with specific cell-mediated immunity parameters in canine leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 116(3-4), 190–198.
- Rodríguez-Cortés, A., Ojeda, A., López-Fuertes, L., Timón, M., Altet, L., Solano-Gallego, L., Alberola, J. (2007). A long term experimental study of canine visceral leishmaniasis. *International Journal for Parasitology*, 37(6), 683–93.
- Rodríguez-Cortés, A., Ojeda, A., Todolí, F., & Alberola, J. (2013). Performance of commercially available serological diagnostic tests to detect *Leishmania infantum* infection on experimentally infected dogs. *Veterinary Parasitology*, 191(3-4), 363–6.
- Rolão, N., Martins, M. J., João, A., & Campino, L. (2005). Equine Infection with *Leishmania* in Portugal. *Parasite*, 12, 183–186.
- Romero, M. H., López, M. C., Echeverry, M. ., & Rivas, F. (2008). Leishmaniasis Visceral Canina: Pruebas Diagnósticas no identifican Estados Reales de la Infección. *Rev. Salud Pública* 10 (2), 10(2), 290–298.
- Rosati, S., Ortoffi, M., Profiti, M., Mannelli, A., Mignone, W., Gradoni, L., & Bollo, E. (2003). Prokaryotic Expression and Antigenic Characterization of Three Recombinant *Leishmania* Antigens for Serological Diagnosis of Canine Leishmaniasis Prokaryotic Expression and Antigenic Characterization of Three Recombinant *Leishmania* Antigens for Serological. *Clinical and Vaccine Immunology*, 10(6), 1153–1156.
- Rosypal, A. C., Troy, G. C., Zajac, A. M., Frank, G., & Lindsay, D. S. (2005). Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. *The Journal of Parasitology*, 91(4), 970–2.
- Roze, M. (2013). Canine Leishmaniasis - an update. *Ejcap*, 23(2), 1–16.
- Rudoler, N., Baneth, G., Eyal, O., van Straten, M., & Harrus, S. (2012). Evaluation of an attenuated strain of *Ehrlichia canis* as a vaccine for canine monocytic ehrlichiosis. *Vaccine*, 31(1), 226–33.
- Sabate, D., Gomez-Ochoa, P., Jorge, L., Homedes, J., & Ferrer, L. (2013). Domperidone is an effective treatment for mild cases (leishvet stage I) of canine leishmaniosis: a double blind placebo controlled trial. In *Proceedings of the Worldleish 5 Congress, Pernambuco* (pp. 4–5).

- Santos, J., Dantas-torres, F., Mattos, Mrf., Lino, F., Andrade, Lss., Souza, R., Simões-Mattos, L. (2010). Prevalência de anticorpos anti-*leishmania* spp em cães de Garanhuns , Agreste de Pernambuco. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 43(1), 41–45.
- Santos-Gomes, G. M., Campino, L., & Abranches, P. (2000). Canine experimental infection: intradermal inoculation of *Leishmania infantum* promastigotes. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 95(2), 193–8.
- Saridomichelakis, M. N. (2009). Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis: epidemiologic and diagnostic implications. *Veterinary Dermatology*, 20(5-6), 471–489.
- Saridomichelakis, M. N., Mylonakis, M. E., Leontides, L. S., Koutinas, A. F., Billinis, C., & Kontos, V. I. (2005). Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 73(1), 82–6.
- Sasani, F., Javanbakht, J., Samani, R., & Shirani, D. (2014). Canine cutaneous leishmaniasis. *Journal of Parasitic Diseases*.
- Schallig, H. D. F. H., Schoone, G. J., Beijer, E. G. M., Kroon, C. C. M., Hommers, M., Ozbel, Y., da Silva, E. D. (2002). Development of a fast agglutination screening test (FAST) for the detection of anti-*Leishmania* antibodies in dogs. *Veterinary Parasitology*, 109(1-2), 1–8.
- Schrey, C. F., Pires, C. A., & Macvean, D. W. (1989). Distribution of phlebotomine sandflies and the rate of their infection with *Leishmania* promastigotes in the Algarve, Portugal (resumo online) *Medical and Veterinary Entomology*, 3(2), 125–130. Acedido a 3 de maio de 2014, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2519654>
- Seixas, R., Alho, A. M., Guerra, D., & Madeira de Carvalho, L. (2011). Doenças caninas de transmissão vectorial : uma picada com muitas consequências! *Veterinary Medicine*, 1–19.
- Sharma, U., & Singh, S. (2008). Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *Journal of Vector Borne Diseases*, 45(4), 255–72.
- Shaw, S. E., Day, M. J., Birtles, R. J., & Breitschwerdt, E. B. (2001). Tick-borne infectious diseases of dogs. *Trends in Parasitology*, 17(2), 74–80.
- Shaw, S. E., Langton, D. a, & Hillman, T. J. (2009). Canine leishmaniosis in the United Kingdom: a zoonotic disease waiting for a vector? *Veterinary Parasitology*, 163(4), 281–5.
- Silva, A.A.A. G. M. (2009). Leishmaniose canina na zona do Pinhal. Tese de Mestrado Integradado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.
- Silva, F. L., Oliveira, R. G., Silva, T. M. A., Xavier, M. N., Nascimento, E. F., & Santos, R. L. (2009). Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 160(1-2), 55–9.
- Silva, F., dos Santos, J., Netto, E., Bavia, M., Nakatani, M., de Souza, F., et al. (2010). Aspectos clínicos da leishmaniose visceral canina no distrito de Monte Gordo, Camaçari (BA). *Revista Baiana de Saúde Pública*, 34(4), 783–795.
- Slama, D., Haouas, N., Remadi, L., Mezhoud, H., Babba, H., & Chaker, E. (2014). First detection of *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae). *Parasites & Vectors*, 7(1), 51.
- Slappendel, R. J. (1988). Canine leishmaniasis; a review based on 95 cases in the Netherlands. *The Veterinary Quarterly*, 10(1), 1–16.

- Slappendel, R. J., & Teske, E. (1997). The effect of intravenous or subcutaneous administration of meglumine antimonate (Glucantime) in dogs with leishmaniasis. A randomized clinical trial. *The Veterinary Quarterly*, 19(1), 10–3.
- Solano-Gallego, L., Fernández-Bellón, H., Morell, P., Fondevila, D., Alberola, J., Ramis, A., & Ferrer, L. (2004). Histological and Immunohistochemical Study of Clinically Normal Skin of *Leishmania infantum*-infected Dogs. *Journal of Comparative Pathology*, 130(1), 7–12.
- Solano-gallego, L., Kidd, L., Trotta, M., Marco, M. Di, Caldin, M., Furlanello, T., & Breitshwerdt, E. (2006). Febrile Illness Associated with *Rickettsia conorii* Infection in Dogs from Sicily. *Emerging Infectious Diseases*, 12(12), 1985–1988.
- Solano-Gallego, L., Koutinas, a, Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., Baneth, G. (2009). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 165(1-2), 1–18.
- Solano-Gallego, L., Lull, J., Ramos, G., Riera, C., Arboix, M., Alberola, J., & Ferrer, L. (2000). The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Veterinary Parasitology*, 90(1-2), 37–45.
- Solano-Gallego, L., Miró, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., The LeishVet Group. (2011). LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites & Vectors*, 4(Figure 1), 86.
- Solano-gallego, L., Morell, P., Arboix, M., & Alberola, J. (2001). Prevalence of *Leishmania infantum* Infection in Dogs Living in an Area of Canine Leishmaniasis Endemicity Using PCR on Several Tissues and Serology Prevalence of *Leishmania infantum* Infection in Dogs Living in an Area of Canine Leishmaniasis Endemicity Usi.
- Solano-Gallego, L., Riera, C., Roura, X., Iniesta, L., Gallego, M., Valladares, J. E., Portús, M. (2001). *Leishmania infantum*-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. *Veterinary Parasitology*, 96(4), 265–76.
- Solano-Gallego, L., Villanueva-Saz, S., Carbonell, M., Trotta, M., Furlanello, T., & Natale, A. (2014). Serological diagnosis of canine leishmaniosis: comparison of three commercial ELISA tests (Leiscan, ID Screen and *Leishmania* 96), a rapid test (Speed Leish K) and an in-house IFAT. *Parasites & Vectors*, 7(1), 10.
- Stich, R. W., Schaefer, J. J., Bremer, W. G., Needham, G. R., & Jittapalapong, S. (2008). Host surveys, ixodid tick biology and transmission scenarios as related to the tick-borne pathogen, *Ehrlichia canis*. *Veterinary Parasitology*, 158(4), 256–73.
- Tomás, A. M. & Romão, S. F. (2008). Capítulo I: Biologia do Parasita. In Santos-Gomes, G.M., Fonseca, I.M.P. (Eds.). *Leishmaniose canina*. (pp. 7-26) Lisboa: Chaves Ferreira – Publicações, S.A.
- Trainor, K. E., Porter, B. F., Logan, K. S., Hoffman, R. J., & Snowden, K. F. (2010). Eight cases of feline cutaneous leishmaniasis in Texas. *Veterinary Pathology*, 47(6), 1076–81.
- Travi, B. L., Tabares, C. J., Cadena, H., Ferro, C., & Osorio, Y. (2001). Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 64(3-4), 119–24.
- Trópia de Abreu, R., Carvalho, M. D. G., Carneiro, C. M., Giunchetti, R. C., Teixeira-Carvalho, A., Martins-Filho, O. A., Reis, A. B. (2011). Influence of clinical status and parasite load on erythropoiesis and leucopoiesis in dogs naturally infected with *leishmania (Leishmania) chagasi*. *PloS One*, 6(5), e18873.

- Uilenberg, G., Franssen, F. F., Perié, N. M., & Spanjer, a a. (1989). Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. *The Veterinary Quarterly*, 11(1), 33–40.
- Valladares, J. E., Alberola, J., Esteban, M., & Arboix, M. (1996). Disposition of antimony after the administration of N-methylglucamine antimoniate to dogs. *Veterinary Record*, 138(8), 181–183.
- Valladares, J. E., Riera, C., Alberola, J., Gállego, M., Portús, M., Cristòfol, C., Arboix, M. (1998). Pharmacokinetics of meglumine antimoniate after administration of a multiple dose in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology*, 75(1), 33–40.
- Van der Meide, W. F., Schoone, G. J., William, R., Zeegelaar, J. E., Vries, H. J. C. De, Özbel, Y., Schallig, H. D. F. H. (2005). Quantitative Nucleic Acid Sequence-Based Assay as a New Molecular Tool for Detection and Quantification of *Leishmania* Parasites in Skin Biopsy Samples Quantitative Nucleic Acid Sequence-Based Assay as a New Molecular Tool for Detection and Quantification. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(11), 5560–5566.
- Vargas-Duarte, J. J., López-Páez, M. C., Escovar-Castro, J. E., & Fernández-Manrique, J. (2009). Evaluacion por Western Blot, Inmunofluorescencia Indirecta y ELISA de Perros Infeccionados con *Leishmania (Leishmania) infantum*. *Rev. Salud Pública*, 11(4), 641–652.
- Veras, D., Fraga, B. M., Solcà, M. da S., & Guedes, C. E. S. (2014). New Advances in the Diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis. In D. Claborn (Ed.), *Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment*. InTech. doi:10.5772/57067
- Veras, P. S. T., Fraga, D. B. M., Solcà, M. S., & Guedes, C. E. S. (2014). New Advances in the Diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis. In *Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment* (pp. 239–273).
- Vieira, A. M. M. (2013). Leishmaniose Canina, Estudo de casos clínicos. Tese de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Disponível em: http://repositorio.utad.pt/bitstream/10348/3253/1/msc_ammvieira.pdf
- Virbac Portugal (2014). Leishmaniose. Acedido a 14 de junho de 2014, disponível em: [http://www.virbac.pt/p-virbacptpubpt/display.aspx?srv=p-virbacpt&typ=pub&lang=pt&cmd=view&style=styles/page2.xsl&select=PAGE\[@ID%24eq%24PAGE_93\]](http://www.virbac.pt/p-virbacptpubpt/display.aspx?srv=p-virbacpt&typ=pub&lang=pt&cmd=view&style=styles/page2.xsl&select=PAGE[@ID%24eq%24PAGE_93])
- Vitale, F., Reale, S., Vitale, M., Petrotta, E., Torina, A., & Caracappa, S. (2004). TaqMan-based detection of *Leishmania infantum* DNA using canine samples. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1026(1), 139–43. doi:10.1196/annals.1307.018
- Waner, T., Keysary, A., Bark, H., Sharabani, E., & Harruss, S. (1999). Canine Monocytic Ehrlichiosis - an overview. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 54(4), 103–107.
- World Health Organization (WHO) (2010). Control of the leishmaniasis. Report of a meeting of the *WHO Expert Committee* on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22–26 March 2010.
- World Health Organization (WHO) (2010). First WHO report on neglected tropical diseases.. Acedido a 7 de junho de 2014, disponível em: http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564090_eng.pdf
- World Health Organization (WHO) (2014). Acedido em 23 maio de 2014, disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>
- Yabsley, M. J., McKibben, J., Macpherson, C. N., Cattán, P. F., Cherry, N. a, Hegarty, B. C., Sylvester, W. (2008). Prevalence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis vogeli*, *Hepatozoon canis*, *Bartonella vinsonii berkhoffii*, and *Rickettsia* spp. in dogs from Grenada. *Veterinary Parasitology*, 151(2-4), 279–85.

Capítulo V - Anexos

Anexo 1 - Inquérito realizado aos proprietários dos cães domésticos incluídos no estudo

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa

Estágio MIMV Ana Sofia Filipe Franco Ribeiro

Inquérito no âmbito da “AVALIAÇÃO DE DUAS TÉCNICAS SEROLÓGICAS (IFI E ELISA) E UMA TÉCNICA MOLECULAR (qPCR EM AMOSTRA DE PELE) NO DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO POR *LEISHMANIA INFANTUM* EM CÃES ”

Nome do proprietário: _____

Nome do Animal: _____ Idade: _____ Sexo: _____

Raça: _____ Pelagem: _____

Proveniência do animal:

Animal errante / canil municipal / campanha de adoção / compra loja de animais / compra criador / oferecido

Regime de habitação: interior / exterior / misto

Região do país: _____ Cidade: _____

O animal:

Está sempre em casa _____

Está sempre na rua _____

Está em casa e faz apenas um passeio diário _____

Está em casa e faz mais que um passeio diário _____ Período do dia _____

Dos animais que vão à rua, o passeio é realizado:

Manhã _____

Noite _____

A qq hora do dia _____

De manhã e noite _____

3x dia (manhã, tarde e noite) ou mais _____

Cohabita com outros animais? Sim / Não

Quais? _____

Desloca-se por Portugal? Sim / Não

Local:

Época do ano:

Desloca-se pelo Estrangeiro? Sim / Não

Local:

Época do ano:

Ecto e endoparasitocidas:

Coleira (marca) _____ **Periodicidade** _____

Spot-on (marca) _____ **Periodicidade** _____

Outros (marca) _____ **Periodicidade** _____

Comprimidos (marca) _____ **Periodicidade** _____

Faz a prevenção contra a Leishmaniose: Sim / Não

O proprietário está familiarizado com a doença?

Sim / Não, Porque?

O seu animal tem alguma doença concomitante? Sim / Não

Está a tomar alguma medicação?

Qual?

História Clínica (Resumo):

Sinais Clínicos e Sintomas:

Anexo 2 - Termo de Responsabilidade



Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa

Termo de Responsabilidade

Proprietário

Nome: _____
Morada: _____
BI /Cartão de Cidadão/Passaporte/Outro (_____) Nº: _____
Contacto telefónico: _____ e-mail: _____

Animal

Nome: _____ Espécie: _____
Raça: _____
Idade: _____ Sexo: _____ Microchip Nº: _____

Intervenção

Colheita de sangue e raspagem cutânea profunda para realização de métodos de diagnóstico de infeção por *Leishmania infantum*/Leishmaniose.

Declaração

Eu, abaixo assinado, declaro que autorizo o(a) Médico Veterinário(a) _____, a realizar as intervenções descritas, no animal acima identificado, para fins de investigação na área de diagnóstico de Leishmaniose. Fui informado(a) e esclarecido(a) sobre o âmbito deste estudo.
Por ser verdade, assino o presente termo de responsabilidade

Lisboa, _____ de _____ de 20____

Ass.

Anexo 3 - Resultados do Inquérito realizado aos proprietários dos cães assistidos no HEFMV e Resultados dos Exames Complementares de Diagnóstico do Grupo A.

ID	Raça	Sexo	Idade (anos)	Porte	Pelagem	Proveniência	Local de Habitação	Concelho de Residência	Nº de passeios diários	Cohabita com outros animais?	Viaja por Portugal?	Localidade e época do ano	Viaja pelo Estrangeiro?	Controlo de Ectoparasitas? Periodicidade	
A1	SRD	M I	3	Grande	Curta	Canil Municipal	Exterior	Almada	1 vez, fim de dia	Cão	Não	-----	Não	1- Imidaclopride + Permetrina Mensalmente	-----
A2	Boerboel	M I	5	Gigante	Curta	Criador	Exterior	Cascais	0	Não	Não	-----	Não	1- Imidaclopride + Permetrina Mensalmente no verão	2- Deltametrina Semestralmente
A3	Terranova	M I	1	Grande	Média	Loja de animais	Exterior	Vila Franca de Xira	0	Cães	Não	-----	Não	1- Imidaclopride + Permetrina Trimestralmente	2- Deltametrina Irregular
A4	Weimareiner	M I	7	Grande	Curta	Oferecido	Misto	Oeiras	1 vez, fim de dia	Não	Não	-----	Não	1- Imidaclopride + Permetrina Verão	2- Deltametrina Irregular
A5	Dogue Alemão	F I	1	Gigante	Curta	Criador	Misto	Azambuja	0	Cães, aves	Não	-----	Não	1- Imidaclopride + Permetrina Mensalmente	-----
A6	SRD	M I	2	Médio	Curta	Oferecido	Exterior	Odivelas	0	Cães	Sim	Álcacer do Sal (Out. a Fev.)	Não	2- Deltametrina Irregular	-----
A7	Golden Retriever	M I	4	Grande	Média	Criador	Misto	Cascais	2 vezes, manhã e fim de dia	Não	Não	-----	Não	1- Imidaclopride + Permetrina Mensalmente	

Legenda: Grupo A - Cães com Leishmaniose e simultaneamente infectados com agentes de outras doenças caninas transmitidas por vetores; SRD - Sem Raça Definida; M - Macho; F - Fêmea; I - Inteiro/a; 1- *Spot on* ; 2- Coleira impregnada com Deltametrina.

Anexo 3 - Continuação dos Resultados do Inquérito realizado aos proprietários dos cães assistidos no HEFMV e Resultados dos Exames Complementares de Diagnóstico do Grupo A.

ID	Controlo de endoparasitas? Periodicidade	Considera fazer a prevenção contra a Leishmaniose?	Conhecedor da doença?	Sinais Clínicos compatíveis com Leishmaniose	Alterações Hematológicas e Bioquímicas *1	IRC	IFI (1:80)	ELISA (Rz)	qPCR (CT's)	Infeções/Doenças Concomitantes *2	Terapêutica em curso	Eutanásia?
A1	Sim 4 em 4 meses	Não	Não	Epistáxis unilateral, > LN pré-escapulares, mucosas pálidas, prostração.	Anemia NN, leucocitose, neutrofilia, Hipergamaglobulinémia, proteinúria.	Sim (estadio I)	Pos	Pos (3,96)	Pos (32,6)	<i>Babesia canis</i> (1/32)	Marbofloxacina (PO)	Não
A2	Sim 1 vez por ano	Sim	Sim	Artrite generalizada, higroma nos cotovelos, linfadenomegália generalizada.	Anemia NN. Sem proteinograma ou urianálise realizados.	Não	Pos	Pos (3,1)	Pos (37,3)	<i>Babesia canis</i> (1/32), <i>Rickettsia conorii</i> (1/40)	-----	Não
A3	Sim 4 em 4 meses	Não	Sim	Epistáxis bilateral, higroma nos cotovelos, mucosas pálidas; prostração.	Anemia NN, leucocitose, Trombocitose, Hipoalbuminémia, > PTs, > Crea. Sem proteinograma realizado.	Não	Pos	Pos (3,3)	Pos (25)	<i>Babesia canis</i> (1/32), <i>Rickettsia conorii</i> (1/40)	-----	Não
A4	Sim 1 vez por ano	Não	Sim	> LN retrofaríngeos, mucosas pálidas.	Anemia NN, leucocitose, trombocitopenia, neutrofilia, > FAS, > ureia, hematúria, alfa/betaglobulinémia.	Não	Pos	Pos (2,6)	Pos (38,5)	<i>Rickettsia conorii</i> (1/40)	Doxiciclina (PO), Ampicilina (SC) (instituída muito recentemente)	Não
A5	Sim Semestralmente	Não	Sim	Hipertermia, linfadenomegália, lesão da trufa, bordo das orelhas E tarsos, edema extremidades, prostração, esplenomegália.	Hematúria, proteinúria, > Crea. Sem proteinograma realizado.	Sim (estadio III)	Pos	Pos (7,6)	Pos (36,6)	<i>Babesia canis</i> (1/32), <i>Rickettsia conorii</i> (1/40)	-----	Não
A6	Sim Irregular	Sim	Sim	Descamação e outras lesões cutâneas generalizadas, alopecia periocular, onicogribose, caquexia, blefarite, cegueira, uveíte hipertensiva bilateral.	Anemia NN, hipoalbuminémia. Sem proteinograma ou urianálise realizados.	Não	Pos	Pos (5,1)	Neg	<i>Ehrlichia canis</i> (1/50)	Dorzolamida + Timolol (O), Diclofenac sódico (O), Prednisolona (PO)	Sim
A7	Sim 4 em 4 meses	Não	Não	Perda de peso, caquexia, mucosas pálidas, esplenomegália; prostração.	Anemia NN, proteinúria, > ureia e crea. Sem proteinograma ou urianálise realizados.	Não	Pos	Pos (7,0)	Pos (25,4)	<i>Rickettsia conorii</i> (1/40)	-----	Sim

Legenda: Grupo A - com Leishmaniose e simultaneamente infectados com agentes de outras doenças caninas transmitidas por vetores;
 *1 - Informação obtida fora do âmbito deste estudo; > - aumento; LN - Linfonodos; NN- Normocítica Normocrômica; Crea- Creatinina;
 Pos- Positivo; Neg- Negativo; *2 - Resultados obtidos em laboratórios externos, cut-off Babesia (1/32) e cut-off Rickettsia (1/40); PO- Via Oral;
 SC- Via Subcutânea; O- Via Ocular.

Anexo 3 - Resultados do Inquérito realizado aos proprietários dos cães assistidos no HEFMV e Resultados dos Exames Complementares de Diagnóstico do Grupo B.

ID	Raça	Sexo	Idade (anos)	Porte	Pelagem	Proveniência	Local de Habitação	Concelho de Residência	Nº de passeios diários	Cohabita com outros animais?	Viaja por Portugal?	Localidade e época do ano	Viaja pelo Estrangeiro?	Controlo de ectoparasitas? Periodicidade?	
B1	SRD	M I	9	Pequeno	Média	Campanha de adoção	Misto	Lisboa	1 vez, fim de dia	Não	Não	----	Não	1- Imidaclopride + Permetrina Mensalmente	----
B2	Cavalier King Charles Spaniel	F C	6	Pequeno	Longa	Criador	Interior	Lisboa	Mais que 3 vezes por dia	Não	Sim	Coimbra (verão)	Não	1- Imidaclopride + Permetrina ou Selamectina Mensalmente no verão	2- Deltametrina Semestralmente
B3	SRD	M I	5	Pequeno	Média	Cão errante	Misto	Lisboa	1 vez, fim de dia	Não	Não	----	Não	Não	
B4	SRD	M I	2	Médio	Curta	Cão errante	Misto	Lisboa	0	Cão, gato	Não	----	Não	Não	
B5	Retriever do Labrador	F C	13	Grande	Média	Criador	Misto	Almada	2 vezes, manhã e fim de dia	Cão	Não	----	Não	----	2- Deltametrina Semestralmente
B6	Yorkshire Terrier	F I	11	Pequeno	Longa	Criador	Interior	Lisboa	1 vez, fim de dia	Não	Sim	Porto (dez., abril)	Sim (Suíça)	1- Imidaclopride + Permetrina Mensalmente no verão	2- Deltametrina Irregular
B7	Spaniel Bretão	M I	11	Médio	Média	Criador	Misto	Odivelas	0	Cão	Sim	Sertã (mensalmente)	Não	1- Imidaclopride + Permetrina Irregular	----
B8	SRD	M I	5	Grande	Média	Cão errante	Interior	Cascais	Mais que 3 vezes por dia	Gatos	Sim	Leiria (semanalmente)	Não	1- Imidaclopride + Permetrina Mensalmente	2- Deltametrina Semestralmente
B9	Retriever do Labrador	F I	9	Grande	Curta	Oferecido	Interior	Lisboa	3 vezes por dia	Cão, gatos	Não	----	Não	1- Imidaclopride + Permetrina Mensalmente no verão	2- Deltametrina Irregular
B10	Jack Russel Terrier	F I	1	Pequeno	Curta	Oferecido	Interior	Odivelas	2 vezes, manhã e fim de dia	Não	Sim	Portalegre (mensalmente)	Não	1- Imidaclopride + Permetrina ou 3- Fipronil Mensalmente	2- Deltametrina Semestralmente

Legenda: Grupo B - Cães doentes com outras doenças (excluindo Leishmaniose); SRD - Sem Raça Definida; M - Macho; F - Fêmea; I - Inteiro/a; C - Castrado/a; 1- Spot on; 2- Coleira impregnada com Deltametrina; 3- Pulverizações.

**Anexo 3 - Continuação dos Resultados do Inquérito realizado aos proprietários dos cães assistidos no HEFMV e
Resultados dos Exames Complementares de Diagnóstico do Grupo B.**

ID	Controlo de endoparasitas? Periodicidade	Considera fazer a prevenção contra a Leishmaniose?	Conhecedor da doença?	Sinais Clínicos compatíveis com Leishmaniose	Alterações Hematológicas e Bioquímicas *1	IRC	IFI (1:80)	ELISA (Rz)	qPCR (CT's)	Infeções/Doenças Concomitantes *2	Terapêutica em curso	Eutanásia
B1	Sim	Sim	Sim	Inexistentes	Hematúria, > ALT	Não	Neg	Neg	Neg	Otite bilateral, Gastrite, ITU	Enrofloxacina (PO), Sucralfato (PO), Digluconato de Clorhexidina (A)	Não
B2	Sim	Sim	Sim	Inexistentes	> ALT	Não	Neg	Neg	Neg	Colite	Omeprazol (PO), Sucralfato (PO), SAME + Silibina (PO), Amoxicilina + Ácido Clavulânico (PO), Metronidazol (PO)	Não
B3	Não	Não	Sim	Inexistentes	Anemia, trombocitopenia, neutrofilia, > ALT	Não	Neg	Neg	Neg	<i>Ehrlichia canis</i> (1/50), <i>Rickettsia conorii</i> (1/80) Politraumatizado	Carprofeno (SC), Amoxicilina + Ácido Clavulânico (SC), Cloridrato de Tramadol (PO), Famotidina (PO)	Não
B4	Não	Não	Sim	Descamação e alopecia generalizadas.	Leucopenia	Não	Neg	Neg	Neg	Demodexose generalizada	Cefalexina (PO), Selamectina (T), Amitraz (T)	Não
B5	Sim	Sim	Sim	Inexistentes	Sem alterações	Não	Neg	Neg	Pos (39,2)	Lipomas, epitelioma	Amoxicilina + Ácido Clavulânico (PO)	Não
B6	Não	Não	Sim	Inexistentes	Sem alterações	Não	Neg	Neg	Neg	Hiperadrenocorticism, Diabetes mellitus, Úlcera da córnea	Insulina de Zinco (SC), Flurbiprofeno sódico (O), Trilostano (PO)	Não
B7	Sim	Não	Não	Prostração, Hipertermia, Linfadenomegalia.	Anemia, > ureia, > crea, > K ⁺	Não	Neg	Neg	Neg	<i>Rickettsia conorii</i> (1/40)	-----	Sim
B8	Sim	Sim	Sim	Inexistentes	Não foram feitas análises	Não	Neg	Neg	Neg	Atopia, Otite bilateral	Polimixina B + Miconazol + Prednisolona (A)	Não
B9	Sim	Não	Sim	Zonas de descamação cutânea, Alopecias, Hipertermia.	Leucopenia, beutropenia, trombocitopenia, > ALT	Não	Neg	Neg	Pos (39,6)	Atopia, <i>Rickettsia conorii</i> (1/40)	Doxiciclina (PO), Amoxicilina + Ácido Clavulânico (PO), Aceponato de hidrocortisona (T)	Não
B10	Não	Não	Não	Inexistentes	Não foram feitas análises	Não	Neg	Neg	Neg	Atopia	Prednisolona (PO), Aceponato de hidrocortisona (T)	Não

Legenda: Grupo B - Cães doentes com outras doenças (excluindo Leishmaniose); *1 - Informação obtida fora do âmbito deste estudo; > - aumento; LN - Linfonodos; NN - Normocítica Normocrômica; Crea - Creatinina; Pos - Positivo; Neg - Negativo; *2 - Alguns resultados obtidos em laboratórios externos, cut-off *Ehrlichia* (1/50) e cut-off *Rickettsia* (1/40); PO - Via Oral; A - Via Auricular; SC - Via Subcutânea; T - Via tópica; O - Via Ocular.

Anexo 3 - Resultados do Inquérito realizado aos proprietários dos cães assistidos no HEFMV e Resultados dos Exames Complementares de Diagnóstico do Grupo C.

ID	Raça	Sexo	Idade (anos)	Porte	Pelagem	Proveniência	Local de Habitação	Concelho de Residência	Nº de passeios diários	Cohabita com outros animais?	Viaja por Portugal?	Localidade e época do ano	Viaja pelo Estrangeiro?	Controlo de Ectoparasitas? Periodicidade	
C1	Boxer	M I	9	Grande	Curta	Criador	Misto	Oeiras	2 vezes, manhã e fim de dia	Cão	Não	-----	Não	1- Imidaclopride + Permetrina Mensalmente	2- Deltametrina Semestralmente
C2	SRD	M C	4	Pequeno	Média	Oferecido	Misto	Lisboa	2 vezes, manhã e fim de dia	Cão	Sim	Lousã (verão)	Não	1- Imidaclopride + Permetrina Mensalmente	-----
C3	SRD	F C	1	Médio	Curta	Cão errante	Misto	Cascais	2 vezes, manhã e fim de dia	Cães	Não	-----	Não	1- Imidaclopride + Permetrina Trimestralmente	2- Deltametrina Semestralmente
C4	SRD	F C	8	Médio	Média	Oferecido	Misto	Vila Real	0	Cão, chinchila	Não	-----	Não	-----	2- Deltametrina Semestralmente
C5	SRD	M C	8	Médio	Média	Oferecido	Misto	Vila Real	0	Cão, chinchila	Não	-----	Não	-----	2- Deltametrina Semestralmente
C6	Bulldog Francês	F C	1	Pequeno	Curta	Criador	Interior	Almada	3 vezes	Cão	Sim	Pelo país, todo o ano.	Não	1- Imidaclopride + Permetrina Trimestralmente	-----
C7	Baixote	M I	7	Pequeno	Média	Oferecido	Misto	Lisboa	1 vez, fim de dia	Cão	Sim	Nisa, todo o ano	Não	-----	2- Deltametrina Semestralmente
C8	Retriever do Labrador	M I	4	Grande	Curta	Oferecido	Misto	Almada	0	Cão	Não	-----	Não	1- Imidaclopride + Permetrina Irregular	2- Deltametrina Semestralmente
C9	Yorkshire Terrier	M I	5	Pequeno	Longa	Criador	Misto	Loures	0	Cobaíes, aves, peixes	Sim	Nisa, temporadas de 6 meses	Não	1- Imidaclopride + Permetrina Trimestralmente	-----
C10	Podengo Português médio	M I	4	Médio	Média	Cão errante	Interior	Almada	2 vezes, manhã e fim de dia	Cão	Sim	Alentejo e Algarve, meses de verão	Não	1- Imidaclopride + Permetrina Mensalmente	

Legenda: Grupo C - Cães clinicamente saudáveis; SRD - Sem Raça Definida; M - Macho; F - Fêmea, I - Inteiro/a; C - Castrado/a; 1- *Spot on*; 2- Coleira impregnada com Deltametrina.

Anexo 3 - Continuação dos Resultados do Inquérito realizado aos proprietários dos cães assistidos no HEFMV e Resultados dos Exames Complementares de Diagnóstico do Grupo C.

ID	Controlo de endoparasitas? Periodicidade	Considera fazer a prevenção contra a Leishmaniose?	Familiarizado com a doença?	Sinais Clínicos compatíveis com Leishmaniose	Alterações Hematológicas e Bioquímicas	IFI (1:80)	ELISA (Rz)	qPCR (CT's)	IRC	Infeções/ Doenças Concomitantes	Terapêutica em curso	Eutanásia?
C1	Sim 4 em 4meses	Sim	Sim	Não	AD	Neg	Neg	Neg	Não	Não	Não	Não
C2	Sim 4 em 4meses	Sim	Sim	Não	AD	Neg	Neg	Neg	Não	Não	Não	Não
C3	Sim Trimestralmente	Sim	Sim	Não	AD	Neg	Neg	Neg	Não	Não	Não	Não
C4	Sim Semestralmente	Sim	Sim	Não	AD	Neg	Neg	Neg	Não	Não	Não	Não
C5	Sim Semestralmente	Sim	Sim	Não	AD	Neg	Neg	Neg	Não	Não	Não	Não
C6	Sim Irregular	Não	Sim	Não	AD	Neg	Neg	Neg	Não	Não	Não	Não
C7	Sim 4 em 4meses	Sim	Sim	Não	AD	Neg	Neg	Neg	Não	Não	Não	Não
C8	Sim 4 em 4meses	Sim	Sim	Não	AD	Neg	Neg	Neg	Não	Não	Não	Não
C9	Não	Não	Não	Não	AD	Neg	Neg	Neg	Não	Não	Não	Não
C10	Sim 4 em 4meses	Não	Sim	Não	AD	Neg	Neg	Pos (36.7)	Não	Não	Não	Não

Legenda: Grupo C - Cães clinicamente saudáveis; AD - Ausência de dados; Neg - Negativo; Pos - Positivo.

Anexo 3 - Tabela com os Resultados do Inquérito realizado aos proprietários dos cães assistidos no HEFMV e Resultados dos Exames Complementares de Diagnóstico do Grupo D.

ID	Raça	Sexo	Idade (anos)	Porte	Pelagem	Proveniência	Local de Habitação	Concelho de Residência	Nº de passeios diários	Cohabita Com outros animais?	Viaja por Portugal?	Localidade e época do ano	Viaja pelo Estrangeiro?	Controlo de Ectoparasitas? Periodicidade	
D1	Husky Siberiano	M I	13	Grande	Média	Criador	Misto	Lisboa	1 vez, fim do dia	Não	Sim	Santarém Fins de semana	Não	1- Imidaclopride + Permetrina Irregular	-----
D2	SRD	F I	10	Grande	Curta	Cão errante	Exterior	Cascais	0	Cão	Não	-----	Não	3- Fipronil Mensalmente	----
D3	Pit Bull	M C	5	Grande	Curta	Canil Municipal	Interior	Lisboa	2 vezes, manhã e fim de dia	Não	Sim	Algarve, o ano inteiro	Não	1- Imidaclopride + Permetrina Irregular	2- Deltametrina Semestralmente
D4	Pastor Alemão	F I	11	Grande	Média	Oferecido	Exterior	Lisboa	0	Cães	Não	-----	Não	1- Imidaclopride + Permetrina Trimestralmente	2- Deltametrina Semestralmente
D5	Pastor Alemão	F C	7	Grande	Média	Criador	Exterior	Lisboa	0	Cão <u>com LCan</u>	Sim	Coimbra, C.Branco, verão	Não	1- Imidaclopride + Permetrina Irregular	2- Deltametrina Semestralmente
D6	Pastor Alemão	M I	8	Grande	Média	Criador	Exterior	Lisboa	0	Cão <u>com LCan</u>	Sim	Coimbra, C.Branco, verão	Não	-----	2- Deltametrina Semestralmente
D7	Retriever do Labrador	M I	5	Grande	Curta	Criador	Exterior	Loures	0	Cão, Réptil	Sim	Lisboa, o ano inteiro	Não	1- Imidaclopride + Permetrina ou Permetrina Mensalmente	-----
D8	Retriever do Labrador	M I	8	Grande	Curta	Criador	Exterior	Lisboa	0	Cão	Não	-----	Não	1- Imidaclopride + Permetrina Mensalmente	2- Deltametrina Semestralmente
D9	SRD	F I	5	Médio	Média	Oferecido	Misto	Oeiras	1 vez, fim de dia	Cão	Sim	C. Branco, fins de semana	Não	1- Imidaclopride + Permetrina Mensalmente	-----
D10	SRD	M I	9	Médio	Média	Cão errante	Misto	Sintra	3 vezes, manhã, tarde e noite	Cão	Sim	Algarve, Ourém Fins de semana	Não	1- Imidaclopride + Permetrina Trimestralmente	2- Deltametrina Semestralmente
D11	SRD	M I	5	Médio	Curta	Cão errante	Interior	Sintra	2 vezes, manhã e fim de dia	Cães	Não	-----	Não	1- Imidaclopride + Permetrina Mensalmente	-----
D12	SRD	M I	10	Grande	Curta	Canil Municipal	Misto	Évora	0	Não	Sim	Lisboa, o ano inteiro	Não	1- Imidaclopride + Permetrina Irregular	-----

Legenda: Grupo D - Cães com Leishmaniose (e outras doenças); SRD - Sem Raça Definida; M - Macho; F - Fêmea, I - Inteiro/a, C - Castrado/a; 1- *Spot on*; 2- Coleira impregnada com Deltametrina; 3 - Pulverizações.

Anexo 3 - Continuação dos Resultados do Inquérito realizado aos proprietários dos cães assistidos no HEFMV e Resultados dos Exames Complementares de Diagnóstico do Grupo C.

ID	Controlo de endoparasitas? Periodicidade	Considera fazer a prevenção contra a Leishmaniose?	Conhecedor da doença?	Sinais Clínicos compatíveis com Leishmaniose	Alterações Hematológicas e Bioquímicas *1	IRC	IFI (1:80)	ELISA (Rz)	qPCR (CT's)	Observações
D1	Não	Sim	Sim	Epistaxis, prostração, caquexia.	Anemia, linfocitose, hipergamaglobulinémia. Sem urianálise realizada.	Não	Neg	Pos (1,7)	Neg	-----
D2	Não	Não	Não	Prostração, hipertermia, Poliartrite.	Leucocitose, neutrofilia, > Pts. Sem proteinograma ou urianálise realizados.	Não	Neg	Neg	Pos (40,5)	-----
D3	Sim 4 em 4 meses	Sim	Sim	Lesões peri-oculares, polúria/polidipsia.	Trombocitopenia, hiper(gama/beta/alfa)-globulinémia. Sem urianálise realizada.	Não	Duv	Pos (2,9)	Neg	-----
D4	Não	Sim	Sim	Descamação nas orelhas bilateral	Hiperalfaglobulinémia.	Não	Pos	Pos (1,7)	Neg	L. desde 2009!
D5	Sim Irregular	Sim	Sim	Caquexia, feridas nos membros e bordo das orelhas, onicogribose, > LN poplíteos.	Leucocitose, hipergamaglobulinémia. Sem urianálise realizada.	Não	Pos	Pos (3,6)	Pos (32,1)	-----
D6	Sim Irregular	Sim	Sim	Perda de peso, epistaxis, má condição da pelagem, Feridas cotovelos e tarsos; mucosas pálidas.	Anemia, hipoalbuminémia, bilirubinémia, bilirubinúria. Sem proteinograma ou urianálise realizados.	Não	Pos	Pos (2,9)	Pos (34,7)	-----
D7	Sim Irregular	Não	Sim	Hiperqueratose das almofadinhas plantares.	Hipergamaglobulinémia. Sem urianálise realizada.	Não	Pos	Pos (4,0)	Neg	-----
D8	Não	Sim	Sim	Ferida nos carpos que não cicatrizam, caquexia.	Hiperalfa/gamaglobulinémia, > PTs. Sem urianálise realizada.	Não	Pos	Pos (3,8)	Pos (28,3)	-----
D9	Sim 4 em 4 meses	Sim	Sim	Lesões peri-oculares, no bordo das orelhas, virilhas, tosse emetizante.	Sem alterações no hemograma uo bq. Sem proteinograma ou urianálise realizados.	Não	Neg	Neg	Neg	L. desde 2012!
D10	Sim 4 em 4 meses	Sim	Sim	>LN submandibular, edema cervical e base da língua.	Sem análises sanguíneas. > Ph e densidade urinária. Sem proteinograma realizado.	Sim Estadio II	Neg	Pos (1,9)	Neg	L. desde 2012!
D11	Sim 4 em 4 meses	Não	Sim	Caquexia, má condição da pelagem, hiperqueratose cutânea, artroses.	Anemia, linfopenia, neutrofilia, trombocitose, Hematúria, proteinúria, > ureia, Hiperalfa/gamaglobulinémia.	Sim Estadio III	Pos	Pos (1,8)	Pos (23,4)	-----
D12	Não	Não	Sim	Caquexia, má condição da pelagem alopecia orelhas, > LN sub-mandibulares e poplíteos, corrimento ocular sanguinolento, epistaxis.	Anemia, leucopenia, > PTs, > Ureia e crea. Sem proteinograma ou urianálise realizados.	Sim Estadio II	Pos	Pos (5,2)	Neg	L. desde 2004!

Legenda: Grupo D - Cães com Leishmaniose (e outras doenças); *1 - Informação obtida fora do âmbito deste estudo; LN - Linfonodos;

NN - Normocítica Normocrômica; Crea - Creatinina; Pos - Positivo; Neg - Negativo; Duv - Duvidoso; L. - Leishmaniose.

Anexo 3 - Continuação dos Resultados do Inquérito realizado aos proprietários dos cães assistidos no HEFMV e Resultados dos Exames Complementares de Diagnóstico do Grupo C.

ID	Infeções/Doenças Concomitantes	Terapêutica em curso	Eutanásia
D1	Epilepsia, Neoplasia das glândulas hepatóides	Fenobarbital (PO), Acetato de Osaterona (PO), Amoxicilina + Ácido Clavulânico (PO), Carprofeno (PO), Propentofilina (PO).	Sim
D2	Piômetra, Carcinomas mamários de grau II	Tramadol (PO), Carprofeno (SC), Amoxicilina + Ácido Clavulânico (SC).	Não
D3	Otite bilateral, Atopia	Prednisolona (PO), Alopurinol (PO), Glucantime (SC), Carprofeno (PO), Digluconato de Clorhexidina (A), Aceponato de hidrocortisona (T).	Não
D4		Alopurinol (PO) (irregular).	Não
D5	-----	-----	Não
D6	-----	-----	Não
D7	-----	-----	Não
D8	Otitis crónicas, Megaesófago, Displasia do cotovelo	-----	Não
D9	-----	Alopurinol (PO).	Não
D10	Litíase vesical	Alopurinol (PO), Firocoxib (PO), Omeprazol (PO).	Não
D11	Urolitíase	Doxiciclina (PO), Amoxicilina + Ácido clavulânico (PO), Cloridrato de Tramadol (PO), Famotidina (PO), Cloridrato de Flavoxato (PO).	Sim
D12	IRC, Espondilopatia anquilosante	-----	Sim

Legenda: Grupo D - Cães com Leishmaniose (e outras doenças); PO - Via Oral; A - Via Auricular; SC - Via Subcutânea; T - Via tópica.